



Università di Pisa

Facoltà di Medicina Veterinaria

*Corso di Laurea Specialistica in Medicina
Veterinaria*

Tesi di Laurea:

**“Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nel gatto: metodo
semplificato tramite clearance dello ioexolo”**

Relatore:

Prof.^{ssa} Grazia Guidi

Candidata:

Giulia Biagioni

Correlatore:

Dott.^{ssa} Ilaria Lippi

Anno accademico 2012-2013

*“A Delia, Tiger, Maya, Anacleto, Gigio e
tutti gli animali che incontrerò lungo il
mio cammino di vita e professionale...”*

Indice

<i>Riassunto</i>	6
<i>Summary</i>	7
<i>Premessa</i>	9

INTRODUZIONE

Fisiologia renale: principali funzioni e attività biologiche del rene	11
<i>Meccanismi di base dell'attività renale</i>	11
<i>Attività endocrina e altre funzioni</i>	20
La velocità di filtrazione glomerulare (GFR)	21
<i>La relazione "danno renale- CKD"</i>	21
<i>Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e suo significato clinico</i>	26
<i>Fattori che influenzano la GFR</i>	31
Modelli farmacocinetici	36
<i>Modello mono-compartmentale</i>	37
<i>Modello bi-compartmentale</i>	39
<i>Modello tri-compartmentale</i>	40
<i>Modello non-compartmentale</i>	41
Metodiche di valutazione della GFR nel gatto	43
<i>Metodi che prevedono la raccolta delle urine</i>	45
Clearance urinaria dell'inulina	45
Clearance urinaria della creatinina endogena	47
Clearance urinaria della creatinina esogena	50
<i>Metodi che prevedono la valutazione del decadimento</i>	
<i>Plasmatico di una sostanza</i>	53
Clearance dell'inulina in singola iniezione	53
Clearance dello ioexolo	55
Clearance del Tc-99 pentate	59
<i>Metodo scintigrafico renale</i>	61
Determinazione del Tc-99m-DTPA all'interno del rene	61

SCOPO DELLA TESI	66
MATERIALI E METODI	67
Materiali	67
Strumentazione	67
Soluzioni standard e soluzioni stock	68
Standard interno	68
Condizioni cromatografiche	69
Curve di calibrazione	69
Trattamento degli animali	70
Preparazione dei campioni	73
Analisi farmacocinetica	74
Analisi statistica	75
RISULTATI	76
Analisi t-test	76

Correlazione di Pearson e analisi di Bland-Altman nel gruppo dei gatti clinicamente sani	82
<i>Modello A</i>	82
<i>Modello B</i>	85
<i>Modello C</i>	88
<i>Modello D</i>	91
Correlazione di Pearson e analisi di Bland-Altman nel gruppo dei gatti in Insufficienza renale cronica (CKD)	94
<i>Modello A</i>	94
<i>Modello B</i>	97
<i>Modello C</i>	100
<i>Modello D</i>	103
DISCUSSIONE	106
RINGRAZIAMENTI	111
BIBLIOGRAFIA	114
SITOGRAFIA	121

Riassunto

L' Insufficienza renale cronica (Chronic Kidney Disease- CKD) è una delle patologie più comuni in ambito veterinario e presenta una sempre più crescente incidenza nel gatto, soprattutto in età avanzata. La GFR misura la velocità con cui si forma il filtrato glomerulare per il passaggio del plasma attraverso i glomeruli renali e rappresenta un mezzo di diagnosi precoce di CKD che permette di mettere in evidenza uno stato di Insufficienza renale nei suoi primi stadi di sviluppo, non rilevabile con i marker normalmente utilizzati nella pratica clinica quali valutazione della creatinina e dell'urea plasmatica che permettono di rilevare la presenza della patologia solo quando una buona parte della funzionalità renale è ormai perduta (70% circa).

Lo ioexolo è un mezzo di contrasto non ionico a bassa osmolarità, marker ottimale per la valutazione della GFR sia nell'uomo che negli animali.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'accuratezza di metodi semplificati per la determinazione della clearance dello ioexolo nel gatto, in modo da trovare una metodica facilmente applicabile nella pratica clinica veterinaria.

Gli animali sono stati divisi in due gruppi: HC, gatti clinicamente sani; CKD gatti in Insufficienza renale cronica.

La concentrazione di ioexolo è stata determinata utilizzando un metodo HPLC.

La clearance è stata calcolata dividendo la dose inoculata per l'area sottostante la curva di eliminazione plasmatica (AUC), stabilita tramite un modello non- compartimentale. La clearance è stata standardizzata per il peso corporeo (ml/min/kg).

È stato adottato come metodo di riferimento un metodo a 12 prelievi che prevede campionamenti a 0'-5'-15'-30'-45'-60'- 90'- 180'- 240'- 300'- 420'- 24 h e sono stati testati quattro modelli semplificati: modello A (5'-30'-1 e

4h); modello B (5'-30'-1 e 2 h); modello C (5', 1-2 e 4 h); modello D (5', 30' e 1h).

Tutti i modelli semplificati hanno riportato una buona correlazione con il modello di riferimento in entrambi i gruppi (HC e CKD).

Tra le metodiche analizzate, il miglior compromesso fra accuratezza e semplicità di esecuzione è risultato essere il modello D, che ha presentato una buona correlazione con il modello di riferimento sia nel gruppo HC ($R^2=0,83$, $p<0,0001$) che CKD ($R^2=0,59$, $p<0,032$).

Questo studio, in conclusione, ha messo in evidenza la presenza di un metodo semplificato, accurato e preciso per la determinazione della GFR nel gatto che può facilmente esser utilizzato nella pratica clinica.

Parole chiave: GFR, gatto, ioexolo

Summary

Chronic kidney disease (CKD) is one of the most common disease in veterinary practice and it has a growing incidence in cats, especially in advanced age. GFR measures the rate of glomerular filtration from plasma through renal glomeruli and it represent a means of early diagnosis of CKD that allows to highlight CKD in the early stages of development, that markers normally used in veterinary practice like plasma creatine and urea concentration can't point out: they can detect the presence of the disease only when a good part of renal function is impaired (about 70%).

Iohexol is a nonionic low-osmolality contrast medium used as GFR marker in both animals and humans.

The aim of this study was to evaluate the accuracy of simplified methods for iohexol plasma clearance in cats, in order to find a viable technique easily applicable in veterinary practice.

The animals were divided into two groups: clinical healthy cats (HC) and CKD affected cats (CKD).

Iohexol plasma concentration was determined using an HPLC method.

Clearance was calculated by dividing the injected dose by the area under the plasma elimination curve (AUC) estimated with a non-compartmental

pharmacological model. Clearance was normalized to body weight (ml/min/kg).

The 11-point clearance, with sampling at 5'- 15'- 30'- 45'- 60'- 90'- 180'- 240'- 300'-420'-24 h, was used as a reference for the evaluation of simplified methods. Four simplified methods were tested: Model A (5'-30'-1 and 4 h); Model B (5'- 30'- 1 and 2 h); Model C (5'- 1- 2 and 4 h); Model D (5'- 30' and 1 h).

All the combination showed a good correlation with the reference method in both groups.

The best compromise between accuracy and simplicity of execution was Model D, which had a good correlation with the reference method in HC group ($R^2 = 0,83$, $p < 0,0001$) and in CKD ($R^2 = 0,59$, $p < 0,032$).

In conclusion, this study showed the presence of an accurate, precise, simplified method for the determination of GFR in cats that can easily use in clinical practice.

Key words: GFR, cat, iohexol

Premessa

Il danno renale, inteso come qualsiasi alterazione morfologica a carico delle unità funzionali del rene, comporta nella maggior parte dei casi l'insorgenza di un decadimento progressivo e irreversibile della funzionalità renale e una progressiva distruzione del parenchima renale che esita necessariamente con la morte dell'animale. Essendo il processo cronico e irreversibile, l'unico approccio valido adottato attualmente nella pratica clinica veterinaria si basa sull'attuazione di un programma terapeutico-conservativo volto a rallentare tale processo e a prolungare la vita dell'animale per un tempo più o meno lungo.

Una rilevazione precoce di danno renale potrebbe condurre a una risoluzione del problema prima che questo cronicizzi o potrebbe, attraverso una terapia adeguata, rallentare il processo già dalle prime fasi di sviluppo della malattia, garantendo una prospettiva di vita più lunga nell'animale.

Ad oggi la valutazione della concentrazione plasmatica di urea e creatinina, che rappresentano i metodi di controllo ufficiali della funzionalità renale, restano i principali parametri diagnostici adottati nella maggior parte delle realtà cliniche veterinarie, poiché di facile rilevazione e semplice praticità. Queste consentono però di mettere in evidenza l'eventuale alterazione renale solamente quando oltre il 70% dell'attività renale complessiva risulta compromessa, non rendendo possibile diagnosticare la patologia nei primissimi stadi di sviluppo.

La diagnosi precoce di danno renale risulta invece di estrema importanza per rilevare la presenza di un'alterazione renale, laddove i parametri normalmente rilevati nella pratica clinica (urea e creatinina

plasmatiche) risultino nella norma, quando ancora la funzionalità renale non è compromessa, in modo da intervenire con un piano terapeutico adeguato il più precocemente possibile e in modo da fornire al proprietario dell'animale in questione indicazioni più precise riguardo la prognosi del paziente.

Una delle tecniche diagnostiche adottate per mettere in evidenza precocemente un'eventuale alterazione renale è la valutazione della filtrazione glomerulare (GFR). Questa, basata sulla misurazione della clearance di un marker renale, valuta la reale capacità di filtrazione totale dei reni permettendo di mettere in evidenza anche piccole alterazioni della funzionalità renale che possono esser la base per ulteriori indagini.

INTRODUZIONE

Fisiologia renale: principali funzioni e attività biologiche del rene

Il rene, organo pari localizzato nello spazio retroperitoneale della cavità addominale, è un importante organo emuntore che, attraverso la produzione di urina, permette l'eliminazione dall'organismo di acqua, sostanze organiche e inorganiche, cataboliti del metabolismo cellulare e la rimozione di sostanze tossiche endogene come urea e ammoniaca, ed esogene come farmaci o alcaloidi vegetali¹. Oltre alla funzione principale escretoria, il rene è coinvolto in molteplici processi di natura diversa, essenziali per la sopravvivenza: esso interviene infatti nella regolazione dell'omeostasi e nell'equilibrio acido-base attraverso un processo di regolazione specifico di diversi parametri (regolazione del volume di liquido interstiziale, della concentrazione ionica intra ed extracellulare, della pressione osmotica e del pH dei liquidi corporei); ha un ruolo nella regolazione della pressione arteriosa e della volemia; svolge un'attività endocrina deputata alla regolazione del processo ematopoietico.

Meccanismi di base dell'attività renale

I meccanismi attraverso i quali il rene esplica le proprie funzioni sono: filtrazione, riassorbimento e secrezione.

La filtrazione, processo che avviene a livello glomerulare, porta alla formazione di un liquido simile al plasma, detto ultrafiltrato, il quale proseguendo lungo il tubulo renale andrà incontro a processi di riassorbimento e secrezione.

Il prodotto finale è l'urina definitiva, che l'animale espellerà in ambiente esterno attraverso le vie naturali.

I. FILTRAZIONE GLOMERULARE

Il rene, uno degli organi più irrorati dell'organismo, riceve $\frac{1}{3} - \frac{1}{4}$ della gittata cardiaca e filtra quindi un volume di liquido pari a circa sessanta volte quello della massa plasmatica.

Il sangue che arriva al glomerulo viene a contatto con la barriera glomerulare, rappresentata dal foglietto viscerale della capsula di Bowman, dalla membrana basale e dall'endotelio dei capillari, attraverso cui subisce un processo di filtrazione selettiva.

Il prodotto della filtrazione, che prende il nome di ultrafiltrato, va a raccogliersi nello spazio di Bowman e risulta esser costituito da un liquido con caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle del plasma e con osmolarità pari a quella del plasma .

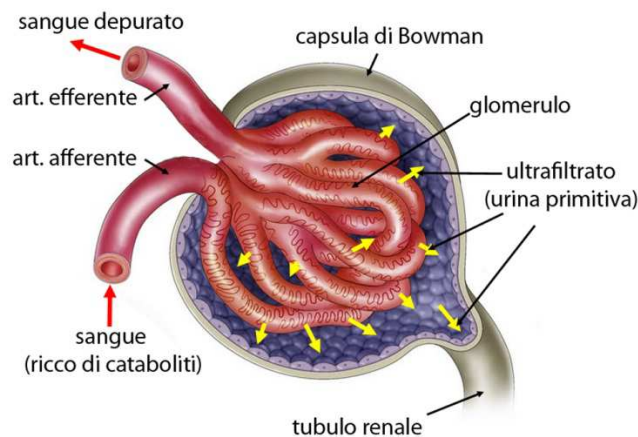


Figura 1: Rappresentazione schematica dell'aspetto morfologico del glomerulo renale^A

Il passaggio di sostanze dal sangue nell'ultrafiltrato dipende dal peso molecolare della sostanza e dal suo diametro: attraverso la barriera

filtrante passano soltanto le molecole con peso molecolare inferiore a 68000 Da e con un diametro inferiore a 60 Å. È permesso quindi per esempio il passaggio di molecole come acqua (2 Å), sodio (4 Å), cloro (3,5 Å), glucosio (7 Å), urea (3,2 Å) ma non di eritrociti (80000 Å), proteine plasmatiche (70-100000 Å) e altri elementi del sangue, che non risulteranno presenti quindi nell'ultrafiltrato².

Ulteriore fattore discriminante il passaggio di una sostanza rispetto ad un'altra è la carica elettrica: contenendo la barriera glomerulare sialoproteine cariche negativamente, è favorito il passaggio nell'ultrafiltrato di molecole cationiche a discapito delle molecole anioniche³. La presenza nelle urine di elementi normalmente assenti in esse rappresenta un segno clinico da prendere in considerazione nella visita clinica del soggetto, poiché possibilmente legata a un'alterazione funzionale o a danno renale.

Tabella 1: Confronto fra i principali componenti del plasma e dell'ultrafiltrato. Il segno (+) indica filtrazione, quello (-) assenza nell'ultrafiltrato.

Componenti plasma	nel Diametro molecola	della Componenti dell'ultrafiltrato
H₂O	2 Å	+
Eritrociti	80000 Å	-
Urea	3,2 Å	+
Glucosio	7 Å	+
Proteine	70-100000 Å	-
Albumine	36-65 Å	+/-
Emoglobina	65 Å	+
Na⁺	4 Å	+
Cl⁻	3,5 Å	+

Il processo di ultrafiltrazione è regolato da forze pressorie uguali a quelle che regolano la formazione del liquido interstiziale nei capillari sistemici e si basa perciò, come quest'ultima, sulla Legge di Starling che, applicata ai capillari glomerulari, risulta:

$$PNF = (P_c + PO_t) - (PO + P_t) \quad \text{dove:}$$

PNF= Pressione netta di filtrazione

P_c = Pressione idrostatica nei capillari

PO_t = Pressione colloidale-osmotica o oncotica dell'ultrafiltrato

PO= Pressione colloidale-osmotica o oncotica del plasma

P_t = Pressione idrostatica nello spazio di Bowman

Da tale formula si deduce che la pressione netta di filtrazione dipende dalla differenza fra le forze pressorie che favoriscono la filtrazione (P_c e PO_t) e le forze che si oppongono alla filtrazione (PO e P_t)².

Poiché in condizioni normali la barriera glomerulare impedisce quasi in toto il passaggio di proteine nell'ultrafiltrato, eccetto una quantità irrisoria di albumine, in un soggetto con reni sani il valore della PO_t può esser trascurato, dando alla stessa un valore 0⁴.

I capillari intraglomerulari, man mano che il sangue penetrato dall'arteriola afferente scorre all'interno del glomerulo verso la arteriola efferente, mantengono una P_c relativamente costante lungo tutto il percorso, mentre subiscono un aumento progressivo della PO man mano che si ha la formazione dell'ultrafiltrato, per la sottrazione di parte della componente liquida e minerale al plasma.

Questo permette una certa regolazione della PNF fino a raggiungere un equilibrio di filtrazione nel punto in cui la PNF risulterà uguale a

zero: non è stato possibile finora determinare sperimentalmente il punto del capillare in cui si raggiunge l'equilibrio poiché questo dipende da variazioni legate alla diversità di specie e variazioni individuali di vario tipo, non raggiungendo mai un valore pari a zero. Nell'uomo e nel cane solitamente il gradiente di filtrazione cade bruscamente dopo filtrazione di circa il 20% della portata plasmatica renale⁴, corrispondente nel cane a un flusso ematico renale di circa 20 ml/min di sangue per kg di peso e a un flusso plasmatico renale pari a 12 ml/min/kg⁵. Nel gatto invece sembra che la P_c risulti maggiore della P_O lungo tutto il letto capillare impedendo il raggiungimento dell'equilibrio di filtrazione⁴.

La capacità di filtrazione renale, nonostante abbia una stretta relazione con la pressione arteriosa sistemica, in condizioni fisiologiche non viene influenzata da essa grazie a una serie di meccanismi compensatori intra- ed extra- renali che regolano la resistenza arteriolare del glomerulo.

Il meccanismo di autoregolazione è un meccanismo compensatorio intrinseco che mantiene costante la PNF attraverso la dilatazione o il restringimento delle arteriole afferente ed efferente, in relazione alla variazione di pressione arteriosa sistemica in atto entro un certo range⁶. Risulta infatti efficace fino a una pressione minima sistolica di 70 mmHg, al di sotto della quale il rene perde la sua capacità di filtrazione, con PNF che raggiunge valori pari a zero quando la pressione minima sistolica arteriolare si porta a 40-50 mmHg.

Variazioni di concentrazione di ioni quali sodio e cloro nell'ultrafiltrato vengono captate dalla macula densa, regione di cellule specializzate del tubulo contorto distale, facente parte dell'apparato iuxtaglomerulare: l'aumento della concentrazione di tali ioni

nell'ultrafiltrato determina la restrizione dell'arteriola afferente con il ripristino di una normale PNF; viceversa, allorquando venga rilevata una scarsa concentrazione di ioni nel prodotto filtrato, l'arteriola afferente si dilata così da incrementare la pressione arteriolare e permettere una maggior filtrazione plasmatica. Questo contribuisce così a regolare la pressione arteriolare e a garantire una filtrazione glomerulare costante.

Una causa frequente di riduzione della pressione sistemica arteriosa e conseguentemente della PNF è l'ipovolemia, ovvero la riduzione del volume di liquidi corporei: questa attiva un meccanismo neuro-ormonale che coinvolge in particolare il sistema nervoso simpatico, con rilascio di norepinefrina la quale direttamente determina un aumento del tono dell'arteriola afferente e indirettamente, tramite la stimolazione del rilascio di renina dalle cellule dell'apparato iuxtaglomerulare, determina attivazione dell'angiotensina II. L'angiotensina II stimola direttamente il riassorbimento di sodio a livello del tubulo contorto prossimale cui consegue per osmosi riassorbimento di acqua e indirettamente, tramite la stimolazione del rilascio di aldosterone dalla corteccia surrenalica, favorisce il riassorbimento di sodio e acqua a livello del dotto collettore, ripristinando così il volume plasmatico e conseguentemente la PNF.

Modificazioni della pressione netta di filtrazione e di conseguenza della quantità di ultrafiltrato formatasi, che in condizioni fisiologiche non si riscontrano, si possono avere in caso di danno renale, con alterazione della barriera glomerulare e escrezione urinaria di proteine plasmatiche: questo determina una riduzione della PO e un aumento della PO_t che esitano in un aumento della filtrazione glomerulare⁴.

II. RIASSORBIMENTO E SECREZIONE

Una volta che, con la filtrazione glomerulare, viene a formarsi l'ultrafiltrato, questo procede lungo il nefrone e a livello del tubulo renale subisce una serie di modificazioni nella sua composizione, grazie a due meccanismi analoghi ma opposti fra di loro: il riassorbimento e la secrezione.

Si parla di riassorbimento quando si ha diffusione di una sostanza dal lume del tubulo renale verso i capillari sanguigni ivi presenti; si parla invece di secrezione quando la diffusione di una sostanza avviene in senso opposto.

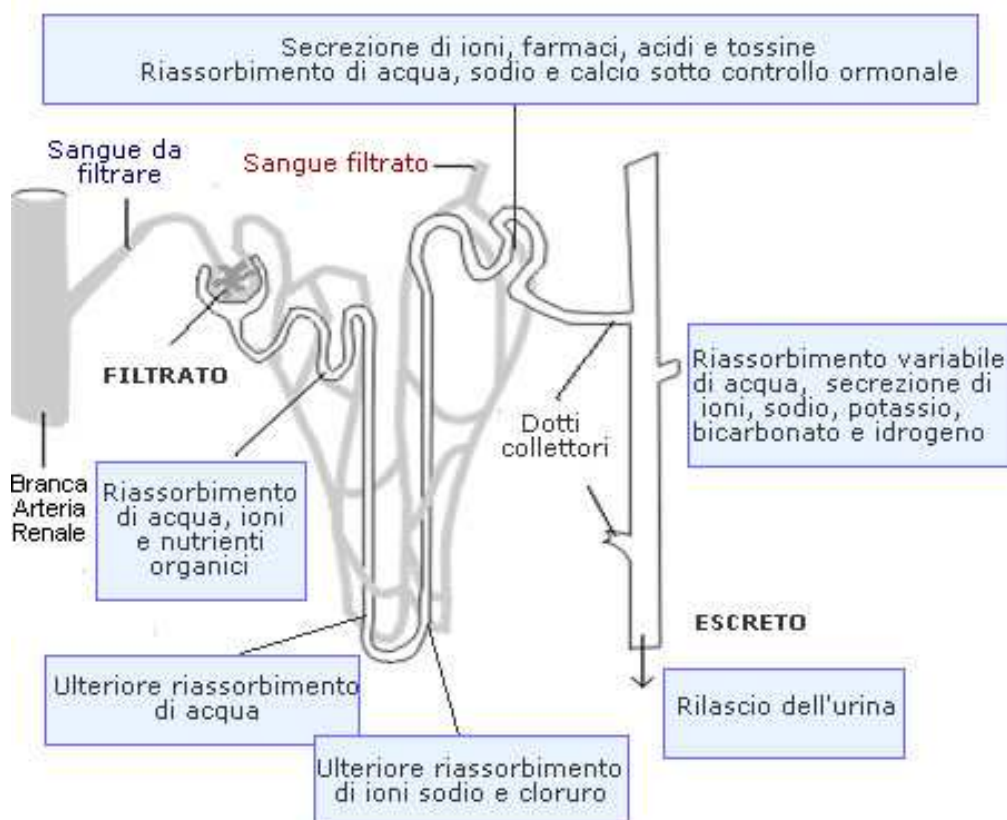


Figura 2: Rappresentazione schematica dei meccanismi di filtrazione, riassorbimento e secrezione che avvengono all'interno del nefrone^B

Riassorbimento e secrezione si basano sui seguenti meccanismi:

Diffusione semplice

È un movimento molecolare casuale basato sulla differenza di potenziale elettrochimico con passaggio di molecole secondo gradiente elettrochimico. Si spostano per diffusione semplice molecole polari, liposolubili, di piccole dimensioni.

Diffusione semplice facilitata

Il passaggio delle molecole avviene secondo gradiente elettrochimico, mediante reazione della molecola con proteine “carriers” di membrana, senza il consumo di energia. Poiché la diffusione è influenzata dalla presenza dei carriers, tale tipo di diffusione presenta le caratteristiche di specificità, competizione e saturabilità tipiche di questo meccanismo di trasporto.

Diffusione facilitata accoppiata di 2 o più sostanze

In questo caso si ha il trasporto di 2 molecole che interagiscono con lo stesso vettore, di cui una si muove secondo gradiente mentre l'altra diffonde per trasporto attivo, contro gradiente, utilizzando l'energia liberatasi dalla diffusione della prima molecola.

Trasporto attivo primario

Il trasporto della molecola interessata è legato alla reazione della stessa con un carrier e comporta un dispendio di energia, ottenuta dalla scissione dell'ATP ad opera dell'ATPasi, in alcuni casi parte costituente dello stesso carrier. Il processo è quasi sempre specifico, saturabile e competitivo².

Il riassorbimento è il principale mezzo attraverso il quale il rene svolge la sua funzione di mantenimento dell'omeostasi, rielaborando gradualmente il liquido filtrato in base alle esigenze momentanee dell'organismo: nel caso in cui l'animale si trovi in uno stato di iperidratazione, il riassorbimento a livello tubulare risulterà ridotto poiché l'organismo non necessita che vengano ripristinate le sue riserve idrico-saline, essendo queste in eccesso; nel caso in cui l'animale presenti invece disidratazione, al contrario, il liquido riassorbito sarà nettamente maggiore per cercare di ristabilire il normale equilibrio idrico-salino dell'organismo, che risulta compromesso.

Il volume di ultrafiltrato prodotto dal rene nelle 24 h è di 180 l circa, corrispondente a un quantitativo di 125 ml di ultrafiltrato al minuto nella giornata, ma la quantità di urina escreta/die è di 1-1,5 l. Questo dimostra quindi che circa il 90% dell' ultrafiltrato prodotto viene riassorbito lungo il nefrone.

Il processo di riassorbimento è specifico e selettivo per ciascuna sostanza ed avviene principalmente a livello del tubulo contorto prossimale dove l'ultrafiltrato è sottoposto a un riassorbimento del 70-80%⁵.

La secrezione tubulare, anch'essa basata sui meccanismi di trasporto sopra descritti, determina il passaggio di molecole dall'interstizio verso il lume tubulare, con direzione opposta rispetto al riassorbimento.

Molte sono le molecole, endogene ed esogene, interessate dal processo di secrezione tubulare: fra le molecole endogene le principali sostanze interessate da tale processo sono gli ioni potassio ed idrogeno, ma molte sono anche le molecole di natura esogena,

utilizzate in campo clinico come farmaci, che vengono eliminate per via renale tramite secrezione (es. penicilline)².

Attività endocrina e altre funzioni

Il rene oltre ad essere un importante organo emuntore, provvedendo alla escrezione di sostanze potenzialmente nocive per l'organismo, interviene in altri processi fisiologici importanti per garantire un'adeguata sopravvivenza dell'organismo.

Tali processi si basano su meccanismi endocrini, coinvolgendo la produzione e la secrezione di importanti ormoni che svolgono funzioni diverse all'interno dell'organismo.

Il rene è responsabile della produzione di eritropoietina (EPO), ormone adibito alla stimolazione dell'eritropoiesi agendo direttamente sul midollo osseo e avviando il processo di maturazione degli eritrociti⁷.

La sede di produzione dell'ormone a livello renale non è ancora chiara, ma si ipotizza che questo venga prodotto dal glomerulo e dall'apparato iuxtaglomerulare, per stimolazione indiretta dovuta a una riduzione della tensione parziale di ossigeno a livello arterioso.

Mentre nel gatto l'ormone viene prodotto anche in sedi extra-renali, a livello dei glomi carotidei, nel cane sembra che l'EPO abbia origine esclusivamente renale: studi effettuati hanno rilevato che in cani nefrectomizzati la sintesi eritropoietica viene quasi completamente depressa, cosa che non accade per altre specie animali. In corso di nefropatie gravi e nell'insufficienza renale, si ha un deficit di produzione di eritropoietina, tanto maggiore quanto più la funzionalità renale è compromessa⁸.

Il rene collabora inoltre con le paratiroidi nella regolazione della calcemia, fungendo da supporto all'azione del paratormone e della

calcitonina attraverso un meccanismo diretto, per diffusione transmembranaria, o indiretto, per azione del paratormone, di riassorbimento o escrezione tubulare di calcio, secondo le necessità dell'organismo. È inoltre responsabile dell'ultima tappa di attivazione della vitamina D a 1,25- OH- colecalciferolo, forma attiva che favorisce l'assorbimento di calcio a livello intestinale e la mobilitazione ossea di calcio in sostegno del paratormone⁹.

Altra importante funzione secondaria renale è rappresentata dalla regolazione della pressione arteriosa sistemica, attraverso il sistema renina-angiotensina. La renina, rilasciata dalle cellule granulose dell'apparato iuxtaglomerulare sotto stimolazione della macula densa, dà l'imput per una serie di trasformazioni che portano alla formazione di Angiotensina III: questa tramite azione diretta, per vasocostrizione, e indiretta, per rilascio di aldosterone a livello surrenale con riassorbimento tubulare di sodio e acqua, influisce sulla pressione arteriosa, determinandone un aumento quando necessario².

La velocità di filtrazione glomerulare

La relazione “danno renale-CKD”

Il termine “danno renale” viene utilizzato per indicare genericamente un'alterazione morfologico-strutturale a carico dei nefroni.

Nel caso in cui la lesione a carico della struttura renale sia irreversibile, la progressione del danno è nella maggior parte dei casi molto lenta e subdola e comporta una progressiva perdita della funzionalità renale non accompagnata da alcuna sintomatologia, fino a determinare

l'instaurarsi di una Insufficienza renale cronica (Chronic Kidney Disease- CKD) che con il tempo porta a morte l'animale¹⁰.

L'assenza di sintomatologia della fase iniziale di CKD, definita *fase stabile o stazionaria*, è legata alla grande capacità compensatoria renale, data dall'instaurarsi di una serie di meccanismi di adattamento che permettono di mantenere costante la funzionalità renale nonostante la perdita progressiva di nefroni.

La riduzione della massa renale si accompagna infatti nel cane e nel gatto entro pochi giorni o settimane dall'instaurarsi del danno ad un aumento delle dimensioni dei glomeruli funzionanti, ad un incremento della GFR dei nefroni superstiti e ad ipertensione glomerulare. Lo stimolo responsabile dell'iniziale ipertrofia renale compensatoria ad oggi ancora non è conosciuto¹¹.

Essendo i reni costituiti da migliaia di nefroni che lavorano in parallelo, la perdita di una certa quota di essi può verificarsi senza che si abbia alcuna evidenza di alterazione della funzionalità di tali organi. Basti pensare infatti che è necessaria la distruzione di circa il 50 % dei nefroni per poter riscontrare una diminuzione della capacità del rene di concentrare le urine e la perdita del 70 % dei nefroni prima che compaiano i primi sintomi di insufficienza renale¹².

La capacità compensatoria renale declina quando i 2/3- 3/4 della capacità funzionale di entrambi i reni siano stati danneggiati, comportando un'incapacità del rene di svolgere le sue normali funzioni¹¹ e determinando un aggravamento progressivo della CKD fino alla sua *fase terminale* o sindrome uremica.

La CKD è per definizione una condizione di costante o progressiva azotemia che si verifica prevalentemente in soggetti di età avanzata, ma che può colpire soprattutto per cause genetiche anche soggetti

Giovani¹³. Superata la fase stabile, che può durare anche mesi, nella quale si ha nella maggior parte dei casi assenza di sintomi, iniziano a manifestarsi una serie di alterazioni a carico di vari apparati, primo fra tutti l'apparato urinario: il sintomo più precoce che insorge in corso di CKD è solitamente la poliuria/polidipsia cui seguiranno una serie di sintomi aspecifici (depressione, debolezza, disidratazione, dimagrimento, anemia), gastroenterici (anoressia, nausea, vomito, diarrea, stomatite), cardiovascolari (ipertensione arteriosa, cardiomegalia, aritmie), neurologici¹¹.

Nel 2006 l'International Renal Interest Society (IRIS) ha pubblicato linee guida internazionali riguardanti la stadiazione dell'Insufficienza renale cronica, con lo scopo di creare una classificazione standardizzata, utilizzabile a livello mondiale.

La classificazione IRIS prevede la suddivisione dei pazienti in 4 stadi di gravità sulla base della concentrazione di creatinina plasmatica, fornendo range di valori specifici per la specie canina e felina.

È inoltre prevista una sottostadiazione mediante la valutazione della proteinuria e la misurazione della pressione arteriosa.

Tabella 2: Classificazione IRIS (International Renal Interest Society) della CKD in base alla creatinina plasmatica^C

Stage	Plasma creatinine μmol/l mg/dl		Comments
	Dogs	Cats	
	<125 <1.4	<140 <1.6	At risk of CKD For patients identified as 'at risk' consider regular screening and taking steps to reduce risk factors
1	<125 <1.4	<140 <1.6	Non-azotemic Some other renal abnormality present e.g. inadequate concentrating ability without identifiable non-renal cause; abnormal renal palpation and/or abnormal renal imaging findings; persistent proteinuria of renal origin; abnormal renal biopsy results, progressively elevating creatinine levels
2	125-179 1.4-2.0	140-249 1.6-2.8	Mild renal azotaemia [lower end of the range lies within the reference range for many labs but the insensitivity of creatinine as a screening test means that animals with creatinine values close to the upper limit of normality often have excretory failure] Clinical signs usually mild or absent.
3	180-439 2.1-5.0	250-439 2.9-5.0	Moderate renal azotaemia Systemic clinical signs may be present
4	>440 >5.0	>440 >5.0	Severe renal azotaemia Systemic clinical signs are usually present

Tabella 3: Sottostadiazione IRIS della CKD in base alla proteinuria^c

<i>UPC value</i>		<i>Substage</i>
Dogs	Cats	
<0.2	<0.2	Non-proteinuric (NP)
0.2-0.5	0.2-0.4	Borderline Proteinuric (BP)
>0.5	>0.4	Proteinuric (P)

Tabella 4: Sottostadiazione IRIS della CKD in base alla misurazione della pressione arteriosa sistemica^c

<i>Systolic BP</i> mm Hg	<i>Diastolic BP</i> mm Hg	<i>Arterial pressure</i> <i>Substage (AP)</i>
<150	<95	0 Minimal Risk
150-159	95-99	1 Low Risk
160-179	100-119	2 Moderate Risk
≥ 180	≥120	3 High Risk

Velocità di filtrazione glomerulare (GFR) e suo significato clinico

La diagnosi e la gestione delle patologie renali risultano essere un punto di notevole importanza in ambito veterinario, considerando che l'Insufficienza renale cronica è una delle più comuni patologie che colpiscono il cane e il gatto (con un'incidenza del 0,5-7% nel cane e 1,6-20% nel gatto)⁸ e prendendo in considerazione il fatto che la patologia si sviluppa in forma silente, grazie all'elevata capacità compensatoria renale, dando manifestazioni cliniche evidenti esclusivamente quando la funzionalità renale è estremamente compromessa.

I marker ancor oggi più utilizzati nella pratica clinica risultano essere la concentrazione plasmatica di urea e di creatinina grazie alla loro praticità di esecuzione, ma questi non permettono di rilevare la presenza di una patologia renale negli stadi iniziali, considerando che il valore della concentrazione di creatinina plasmatica aumenta oltre il range di riferimento solo quando circa il 75% della funzionalità renale risulta compromesso⁴.

La sensibilità e la specificità di tali test si aggirano intorno all'80%, valore considerato la soglia minima per ritenere scientificamente valido un test, con variazioni intraspecifiche nel cane legate al peso corporeo: in cani di peso corporeo superiore a 15 kg è stata riscontrata una sensibilità della valutazione della concentrazione di creatinina dell'80-83%, maggiore di quella riscontrata nei cani con peso inferiore a 15 kg, pari a 75-80%. Tale variazione di sensibilità non è stata riscontrata invece nel gatto.

La concentrazione di urea e di creatinina nel sangue possono subire inoltre notevoli variazioni in dipendenza di fattori extrarenali, incrementando in caso di apporto proteico eccessivo con la dieta,

febbre, disidratazione o emorragie e stati catabolici generici e diminuendo in caso di insufficienza epatica, shunt porto-sistemico e malnutrizione⁸.

Studi effettuati sul cane hanno dimostrato che la concentrazione di creatinina plasmatica può esser influenzata anche dal genere: nel maschio risulta essere più alta per la maggior massa muscolare e per la secrezione attiva di una piccola quantità di creatinina a livello dei tubuli renali, determinando una sovrastima dell'effettiva funzionalità renale⁴.

La velocità di filtrazione glomerulare (GFR), nonostante per la sua complessità di esecuzione non venga utilizzata normalmente nella pratica clinica, risulta essere un mezzo di diagnosi efficace molto più precoce rispetto ai marker più usati, essendo direttamente correlata alla funzionalità effettiva della massa renale: permette infatti di mettere in evidenza un danno renale, non ancora accompagnato da alcuna sintomatologia (come in caso di forme patologiche subcliniche o di pazienti borderline) consentendo al veterinario di diagnosticare precocemente la patologia, programmare il piano terapeutico migliore per rallentare il processo patologico in atto, permettendogli inoltre di fornire informazioni più precise al proprietario circa la prognosi del paziente.

Nelle fasi iniziali di CKD si riscontra infatti una significativa riduzione della GFR con soltanto un lieve incremento della concentrazione plasmatica di creatinina, peraltro con notevoli variazioni individuali, e spesso non si presentano né disquilibri idro-elettrolitici né alterazione dei parametri urinari.

Tuttavia, grazie all'elevata capacità compensatoria renale, a una perdita di funzionalità renale del 50% non si ha una corrispondente

riduzione della GFR, come ci aspetteremmo, bensì la riduzione della GFR si aggira intorno al 20-30%, dato comunque significativo dal punto di vista diagnostico.

Per questo la GFR è ad oggi considerata il “*gold standard test*” per la valutazione della funzionalità renale: il più precoce e l’unico parametro significativo dal punto di vista clinico per effettuare diagnosi di Insufficienza renale cronica¹⁴.

La GFR può esser utilizzata per diversi fini nella pratica clinica:

- Individuazione precoce di disfunzione renale prima dell’instaurarsi dell’azotemia
- Diagnosi di Insufficienza renale in caso di poliuria non associata ad azotemia
- Monitoraggio della progressione del danno renale
- Screening precoce di patologia renale per razze considerate a rischio per nefropatie ereditarie
- Impostazione di una terapia specifica per una patologia renale e valutazione della risposta del paziente a detta terapia
- Determinazione della funzionalità del rene controlaterale, in previsione di un intervento di nefrotomia o nefrectomia
- Modificazione della dose e/o della frequenza di somministrazione di farmaci eliminati per via renale, in animali con disturbi renali⁴

La GFR rappresenta il volume di plasma filtrato dai nefroni per unità di tempo nel processo di formazione delle urine e riflette l’attività glomerulare totale di entrambi i reni, dando una stima quantitativa della funzionalità renale globale sia nell’animale sano che nel malato.

Non essendo possibile una valutazione diretta della GFR poiché l'ultrafiltrato subisce lungo il tubulo renale numerose modificazioni, è necessario ricorrere a un sistema indiretto che permetta di avere un indice dell'attività glomerulare globale, ottenuto attraverso la misurazione della clearance urinaria e/o plasmatica di una sostanza.

Questo metodo si basa sul principio secondo il quale il volume di un liquido equivale al rapporto fra la quantità di un soluto e la sua concentrazione ($V = Q/C$), che applicato al glomerulo renale darà origine a:

$$V_u = Q_u / C_u \quad \text{dove:}$$

V_u = volume dell'ultrafiltrato

Q_u = quantità di sostanza nell'ultrafiltrato

C_u = concentrazione della sostanza nell'ultrafiltrato

Prendendo in considerazione una sostanza liberamente filtrata che non subisce modificazioni lungo il tubulo renale e quindi completamente escreta nell'unità di tempo, risulterà:

$$\text{Quantità escreta/tempo} = Q \text{ filtrata/tempo}$$

Poiché dalla formula sopra si evince che la quantità di soluto in un liquido è data dalla concentrazione della sostanza per il volume del solvente, che nel nostro caso è l'urina, si ottiene che:

$$\text{Quantità escreta/tempo} = U_A \times V / \text{tempo} \quad \text{dove:}$$

U_A = concentrazione della sostanza nelle urine

Unendo le formule sopra, avremo:

$$U_A \times V = Q \text{ filtrata} / \text{tempo}$$

Poiché la quantità di sostanza filtrata è uguale al prodotto del volume di plasma filtrato per la concentrazione della sostanza nell'unità di volume dell'ultrafiltrato, avremo che:

$$U_A \times V = P_A \times \text{GFR} \quad \text{dove:}$$

GFR = volume di plasma filtrato nell'unità di tempo (velocità di filtrazione glomerulare)

P_A = concentrazione della sostanza nel plasma

Da cui deriva che:

$$\text{GFR} = U_A \times V / P_A$$

La clearance di una sostanza (C) indica il volume di plasma interamente depurato da una determinata sostanza in un preciso intervallo di tempo (ml/min)¹⁵. Se la sostanza viene eliminata prevalentemente per via renale, tanto da considerare le altre vie di eliminazione trascurabili, nelle urine ci aspetteremo di trovare la stessa quantità di sostanza depurata dal sangue.

La clearance renale, attraverso la valutazione della concentrazione plasmatica e renale del marker, misura la quantità di sostanza effettivamente escreta con le urine.

Poiché la quantità di sostanza escreta con le urine corrisponde a $U_A \times V$, se ne deduce che:

$$C = U_A \times V / P_A = \text{GFR}, \text{ valore espresso in ml/min}$$

La misurazione della clearance renale di una sostanza perciò, oltre a fornire un indice della capacità di depurazione dell'organismo, permette indirettamente di stimare la GFR e di valutare quindi la funzionalità renale globale.

Il range di valori di riferimento della GFR per indicare una perdita o meno di funzionalità renale variano molto in bibliografia a seconda degli autori, del mezzo di contrasto utilizzato, della metodica di esecuzione adottata e della specie oggetto dello studio.

Tuttavia si può assumere come "GFR normale" un valore di GFR corrispondente approssimativamente a 4 ml/min/kg sia nel cane che nel gatto⁶.

Fattori che influenzano la GFR

La velocità di filtrazione glomerulare rappresenta un mezzo diagnostico molto utile per valutare la funzionalità renale globale, mettendo in evidenza anche piccole alterazioni della stessa: il test ha una maggior sensibilità rispetto ai parametri presi in considerazione normalmente nella pratica clinica in corso di diagnosi di patologia renale.

La valutazione della GFR si basa però su un metodo indiretto attraverso il quale la capacità di filtrazione renale viene misurata calcolando la clearance di una determinata sostanza: non essendo possibile quindi misurare direttamente la GFR, è possibile incorrere in errori dovuti all' influenza di fattori extra-renali che possono determinare una sottostima o una sovrastima del valore di GFR riscontrato.

È importante quindi conoscere tali fattori, in modo da avere una stima veritiera, che rispecchi il più fedelmente possibile la reale funzionalità renale.

-Peso corporeo

Il metodo di standardizzazione più utilizzato in veterinaria per la valutazione della GFR, espressa in ml/min-kg, si basa sul peso corporeo dell'animale (BW), ma è stato dimostrato che il peso corporeo influenza in maniera non trascurabile la GFR. Nel cane infatti si ha una notevole variabilità di taglia che comporta una importante differenza di metabolismo interindividuale e di conseguenza una notevole variabilità nei valori di GFR riscontrati nell'animale sano⁴. Anche nel gatto, nel quale la differenza di taglia è molto più ridotta rispetto al cane, comunque si riscontra una certa influenza del peso corporeo sulla GFR⁸.

Poiché il tasso metabolico è in genere più strettamente correlato alla superficie corporea rispetto al peso corporeo, è più corretto utilizzare un metodo di standardizzazione che metta in correlazione la GFR, espressa in ml/min-m², con la superficie corporea (BSA), metodo utilizzato frequentemente in medicina umana.

Tale metodo è consigliato in sostituzione della standardizzazione mediante il peso corporeo soprattutto nel gatto, poiché in tale specie è stato dimostrato in grado di neutralizzare l'influenza del peso corporeo sulla GFR⁸.

Nei piccoli animali la formula più appropriata per la stima della superficie corporea (BSA) è ancora sconosciuta⁴, tuttavia si può applicare la formula:

$$BSA (m^2) = 4 \times BW(kg) + 7 / 90 + BW(kg) \quad \text{dove:}$$

BW= peso vivo dell'animale

Oppure:

$$BSA (m^2) = K \times (BW)^\alpha / 10^4 \quad \text{dove:}$$

K= costante (10,1 per il cane; 10.0 per il gatto)

α = esponente di massa (0,71 per il cane; 0,66 per il gatto)⁸

Altro metodo di standardizzazione utile per neutralizzare l'effetto del peso corporeo sulla GFR è quello che mette in correlazione la GFR con il volume dei fluidi extracellulari (ECFV), parametro strettamente legato alla capacità di filtrazione glomerulare.

L'utilizzo di tale metodo, tuttavia, ha dato risultati molto variabili e necessita di ulteriori studi per esser considerato valido scientificamente.

Mentre nel cane è stata riscontrata una certa variabilità dei risultati in base al metodo di standardizzazione utilizzato, nel gatto molti studi hanno dimostrato una certa costanza nei risultati ottenuti indipendentemente dal metodo di standardizzazione.

Ad oggi, sulla base degli studi effettuati, non si conosce ancora il modello di standardizzazione ideale per la valutazione della GFR⁴.

-Età

Mentre per l'uomo ormai è dimostrato che l'età ha una certa influenza sulla GFR, determinando modificazioni morfologiche glomerulari accompagnate da riduzione della GFR all'avanzare dell'età (in soggetti sani di età >60 anni si è riscontrata una riduzione della GFR del 20-30% rispetto a soggetti sani di età <50 anni)¹⁶, l'influenza dell'età sulla GFR nel cane e nel gatto non è stata accertata. Nel cane è stata dimostrata una correlazione fra età e modificazioni morfologiche renali, ma non è stato provato se queste siano accompagnate da una modificazione della funzionalità renale, con riduzione della GFR.

L'argomento perciò è ancor oggi dibattuto: vi sono studi che riconoscono una certa influenza dell'età sulla GFR in animali sani¹⁷⁻¹⁸, e altri che hanno riscontrato una totale indipendenza della GFR dall'età sia nel cane che nel gatto¹⁹⁻²⁰.

Inoltre da tali studi non è stata rilevata alcuna interazione fra età e peso corporeo come fattori influenzanti la GFR sia nel cane che nel

gatto, con l'eccezione di cani di piccola taglia, con peso corporeo molto basso, nei quali la GFR non diminuisce con l'aumentare dell'età. Questo è in discordanza con quanto riportato in letteratura per l'uomo, nel quale ad aumentare dell'età corrisponde una riduzione della GFR. Tale discordanza può esser spiegata dalla differente durata di vita delle due specie: il cane ha una vita più breve rispetto all'uomo ed è quindi plausibile pensare che nel cane anziano le alterazioni istopatologiche e funzionali che si hanno nell'uomo anziano non siano ancora presenti⁴.

-Genere

L'influenza del sesso sulla GFR è argomento ancora in fase di studio sia nell'uomo che nei piccoli animali.

Nell'uomo ciò che molti studi hanno dimostrato influenzare la GFR non è tanto il sesso femminile o maschile, quanto invece la correlazione sesso/età: nella donna, infatti, si riscontra una caduta della GFR legata all'età molto più lenta e ritardata rispetto a quanto avviene nell'uomo.

Studi sperimentali sul ratto hanno evidenziato, allo stesso modo, nelle femmine della specie una scarsa influenza dell'età sulla GFR, a differenza del maschio²¹.

Nel cane e nel gatto ad oggi non vi sono dati sufficienti scientificamente validi per poter confermare una influenza del sesso sulla GFR, anche se alcuni studi mostrano che questa dipenda dalla metodologia utilizzata per la valutazione della GFR: le tecniche che adottano la clearance della creatinina possono infatti sovrastimare la GFR nel cane maschio, poiché piccole quantità di creatinina vengono secrete attivamente a livello del tubulo renale⁴.

Nel gatto tale influenza non è stata invece riscontrata.

-Somministrazione di sostanze ormonali, vasoattive o farmacologiche

Molte sono le sostanze esogene ed endogene che possono alterare la GFR determinando una sovrastima o una sottostima della stessa.

La somministrazione di diuretici (furosemide), secondo uno studio svolto sul ratto, determina una riduzione della GFR dovuta a un meccanismo compensatorio che si instaura a livello renale per controbilanciare la perdita di liquidi dall'organismo (feedback tubulo-glomerulare).

Sostanze vasoattive come ADH, angiotensina II, noradrenalina, endoteline, leucotrieni, fattori di crescita determinano, allo stesso modo, una riduzione della GFR.

È interessante sapere che invece, differentemente da quanto ci si possa aspettare, sostanze vasodilatatrici come prostaglandine, acetilcolina e istamina, non hanno alcuna influenza sulla velocità di filtrazione glomerulare²².

Modelli farmacocinetici

Una volta che un marker viene iniettato per via endovenosa per la determinazione della GFR, la sua concentrazione plasmatica raggiunge rapidamente un picco seguito da una caduta esponenziale, dovuta a diluizione della sostanza e successiva diffusione negli spazi extravasali: consideriamo che circa il 70% della dose iniziale lascia il plasma a una

distanza di 2-5 minuti dall'iniezione. La diffusione del marker dal plasma agli spazi extracellulari è accompagnata da una retrodiffusione di acqua e molecole del marker nel plasma finché non viene raggiunto un equilibrio fra il plasma e il compartimento extravasale.

Man mano che il marker poi sarà eliminato per via renale, si avrà una riduzione della sua concentrazione plasmatica con diffusione delle molecole dagli spazi extravasali al plasma. Una piccola frazione del marker può raggiungere anche i compartimenti meno perfusi.

Per il calcolo della GFR possono essere utilizzati diversi modelli che considerano il corpo come una serie di compartimenti attraverso i quali il marker diffonde e si distribuisce nell'organismo.

Per studi inerenti il calcolo della GFR mediante clearance plasmatica di un marker nel cane e nel gatto vengono utilizzati 4 modelli: mono-compartimentale, bi-compartimentale, tri-compartimentale, non-compartimentale.

Modello mono-compartimentale

Il modello mono-compartimentale considera l'organismo come un unico compartimento, nel quale il marker si distribuisce uniformemente subito dopo l'iniezione.

In questo modello la concentrazione plasmatica del marker viene descritta come una funzione mono-esponenziale:

$$C_t = C_0 \times e^{-kt} \text{ dove:}$$

C_t = concentrazione plasmatica del marker al tempo t (mg/dl)

C_0 = concentrazione plasmatica del marker al tempo 0 (mg/dl)

k = costante di velocità di eliminazione (min^{-1})

L'integrale della funzione fra il tempo di iniezione e l'infinito risulta:

$$\text{AUC} = C_0/t \quad \text{GFR} = \text{dose}/\text{AUC}$$

AUC= area sotto la curva concentrazione/tempo

dose= dose del marker somministrata¹⁵

Nel grafico viene a formarsi una curva di distribuzione del marker nel tempo corrispondente a una linea retta, la cui pendenza risulta esser costante via via che il marker si distribuisce nell'organismo.

Il vantaggio del modello mono-compartmentale è dato dal ridotto numero di prelievi necessario per ottenere un risultato significativo. L'errore è legato invece al fatto che l'immediata distribuzione del marker nell'organismo non avviene in condizioni reali⁴.

In alcuni casi tale errore può esser considerato trascurabile per la elevata velocità di distribuzione del farmaco, tanto che il modello mono-compartmentale viene utilizzato spesso in caso di analisi farmacocinetica dei farmaci.

Ma nel caso della valutazione della GFR è stato dimostrato che l'errore prodotto assume una notevole rilevanza clinica: il modello mono-compartmentale infatti determina una sottostima dell'AUC, non calcolando la sua parte iniziale, determinando di conseguenza quindi una sovrastima della GFR di circa il 20-30%.

È perciò sconsigliato l'utilizzo di tale modello nella valutazione della filtrazione glomerulare¹⁵.

Modello bi-compartmentale

Nel modello bi-compartmentale la riduzione della concentrazione plasmatica del marker iniettato è legata all'iniziale diffusione dal compartimento vasale (plasma) a quello extravasale (tessuti corporei), seguita poi dall'eliminazione della sostanza dall'organismo⁴.

La concentrazione plasmatica del marker è in questo caso descritta dalla somma di due funzioni esponenziali:

$$C_t = C_1 \times e^{-\lambda_1 t} + C_2 \times e^{-\lambda_2 t} \quad \text{dove:}$$

C_t = concentrazione plasmatica al tempo t

$C_1 - C_2$ = concentrazione intercetta sulle ordinate

$\lambda_1 - \lambda_2$ = costanti di eliminazione dei due comparti

L'integrale della funzione fra il tempo di iniezione e l'infinito è:

$$AUC = C_1/\lambda_1 + C_2/\lambda_2$$

$$GFR = \text{dose}/AUC^{14}$$

In questo modello la curva di distribuzione del marker nel tempo è rappresentata nel grafico da 2 linee rette: la prima, che decresce rapidamente, rappresenta la rapida distribuzione del marker dal plasma negli spazi extracellulari; la seconda, che decresce più lentamente, rappresenta l'eliminazione della sostanza.

Il modello bi-compartmentale risulta essere più accurato poiché più vicino alla reale distribuzione di un marker nell'organismo, prendendo

in considerazione l'influenza della distribuzione tissutale sulla clearance del marker⁴.

Nonostante questo, in caso di variazioni di volume dei fluidi extracellulari, data la scarsa distribuzione del marker, tale modello risulta inappropriato²³.

Modello tri-compartimentale

Il modello tri-compartimentale prende in considerazione un terzo compartimento, rappresentato dai tessuti più profondi dell'organismo. Il marker diffonde dal plasma ai tessuti extravasali, distribuendosi poi fino ai tessuti più profondi; l'eliminazione che segue la distribuzione avviene dal compartimento centrale (plasmatico).

La funzione con cui viene descritta matematicamente la concentrazione plasmatica del marker è data dalla somma di tre funzioni esponenziali:

$$C_t = C_1 \times e^{-\lambda_1 t} + C_2 \times e^{-\lambda_2 t} + C_3 \times e^{-\lambda_3 t} \quad \text{dove:}$$

C_t = concentrazione plasmatica del marker al tempo t

C_1, C_2, C_3 = concentrazioni intercette sulle ordinate

$\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ = costanti di eliminazione dei tre compartimenti

L'integrale della funzione fra il tempo di iniezione e l'infinito è:

$$\text{AUC} = C_1/\lambda_1 + C_2/\lambda_2 + C_3/\lambda_3$$

$$\text{GFR} = \text{dose}/\text{AUC}$$

La funzione viene rappresentata graficamente con tre linee rette, ciascuna delle quali descrive il decadimento plasmatico del marker in ciascuno dei tre compartimenti.

Il modello tri-compartimentale è un modello sicuramente più accurato dei precedenti, poiché si avvicina molto alla reale distribuzione del marker nell'organismo, ma richiede un numero di campioni elevato, in genere 10-12, sia per determinare la caduta iniziale rapida della concentrazione plasmatica di marker durante la sua distribuzione nei compartimenti dell'organismo, sia per il suo successivo lento decadimento dovuto alla sua eliminazione. È un modello che per questo nella valutazione della GFR nel cane e nel gatto viene solitamente evitato.

Esistono poi altri modelli multi-comportamentali i quali non trovano riscontro nell'analisi farmacocinetica per la valutazione della GFR poiché la maggior accuratezza ottenuta da questi, accompagnata da una notevole complessità di esecuzione, è considerata inutile ai fini del risultato¹⁵.

Modello non-compartimentale

Il modello non-compartimentale non considera l'organismo come un insieme di compartimenti nei quali il marker si distribuisce, ma calcola l'AUC sommando le singole aree che si formano sotto la curva nell'intervallo fra due campionamenti (metodo trapezoidale).

Il metodo non-compartimentale, nel caso in cui il decadimento plasmatico della sostanza sia esponenziale, risulta esser molto accurato e può risultare utile poiché non rende necessario definire

precisamente il numero di compartimenti attraverso i quali la sostanza si distribuisce¹⁵.

Di contro però, poiché la porzione terminale della curva, dall'ultimo campionamento a concentrazione 0, viene calcolata matematicamente, l'incidenza di errori legata a tale metodo è abbastanza elevata⁴.

Il modello farmacocinetico viene solitamente scelto valutando se la curva prevista concorda, in senso statisticamente significativo, con i dati sperimentali.

In questo lavoro è stato adottato tale modello, che dà una stima della GFR sufficientemente accurata in un ampio range di funzionalità renale.

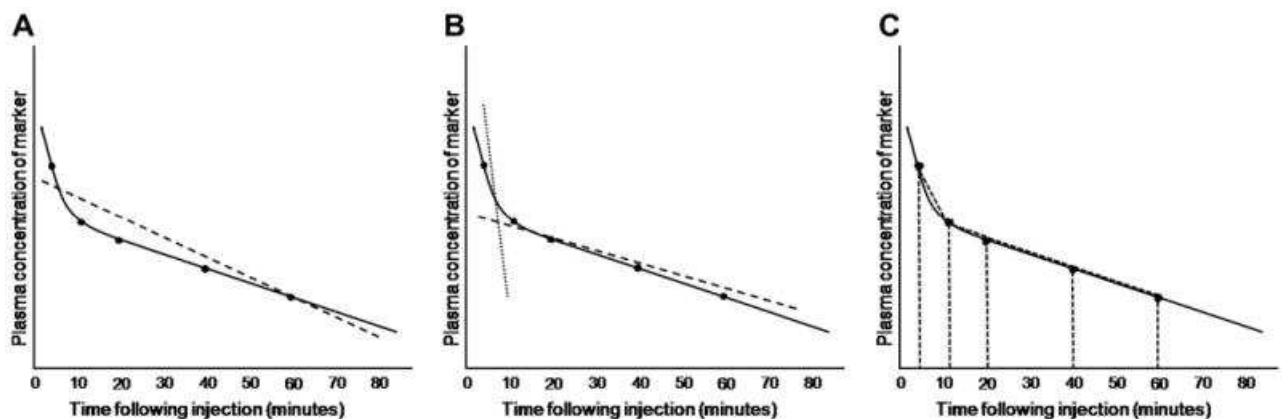


Figura 3: Grafici relativi alla distribuzione di un marker ideale secondo i modelli mono-compartimentale (A), bi-compartimentale (B) e non-compartimentale (C). La linea tratteggiata indica la distribuzione ideale di un marker ipotetico; la linea continua indica la distribuzione reale del marker nel plasma a precisi intervalli di tempo.

Metodiche di valutazione della GFR nel gatto

Molte sono le metodologie utilizzate per la determinazione della GFR nel cane e nel gatto: la GFR può esser valutata infatti mediante metodi basati sulla misurazione della clearance urinaria di una sostanza, metodi che valutano il decadimento plasmatico di un analita o con metodi scintigrafici.

Le sostanze utilizzate per determinare la GFR, che prendono il nome di markers renali, devono presentare specifiche caratteristiche che consentano loro di svolgere in maniera ottimale la funzione per cui vengono utilizzate.

Il marker renale ideale deve:

- Essere trasportato nel sangue in forma libera, non legato a proteine plasmatiche
- Essere liberamente filtrato a livello glomerulare
- Non esser riassorbito né secreto a livello tubulare
- Non esser metabolizzato dall'organismo⁴
- Non influire sul flusso plasmatico renale e sulla velocità di filtrazione glomerulare²

In questo modo, dal momento che il marker filtrato interamente a livello glomerulare non subisce alcuna modificazione lungo il tratto tubulare e viene escreto tal quale, la quota escreta con le urine rappresenta un indice dell'effettiva filtrazione glomerulare e dà un'indicazione sulla funzionalità renale globale.

Nel gatto, ancor più che nel cane, per la sua scarsa collaborazione nelle operazioni veterinarie, le tecniche adottate per la determinazione della GFR trovano problemi nella loro esecuzione:

molte richiedono infatti la raccolta di numerosi campioni in un lasso di tempo più o meno lungo, altre richiedono l'applicazione di un catetere urinario e un'accurata e completa raccolta di urine in un periodo di tempo prolungato.

È per questo motivo che la valutazione della funzionalità renale è ancor oggi purtroppo affidata alla determinazione plasmatica di urea e creatinina, nonostante sia largamente appurato che queste non diano una stima veritiera della reale funzionalità glomerulare.

Poiché la GFR è considerata il miglior indice per la valutazione della funzionalità renale globale, rappresentandone sia per il cane che per il gatto il gold standard test, è necessario per il gatto trovare una metodologia di valutazione della GFR che permetta di avere risultati accurati associati ad una buona praticità di esecuzione, così da incentivare il veterinario ad adottare nella pratica clinica abitualmente la GFR come indice di funzionalità renale.

Metodi per la valutazione della GFR

1. Metodi che prevedono la raccolta di urine:

Clearance urinaria dell'inulina

Clearance urinaria della creatinina endogena

Clearance urinaria della creatinina esogena

2. Metodi che prevedono la valutazione del decadimento plasmatico di una sostanza:

Clearance dell'inulina in singola iniezione

Clearance dello iohexolo

Clearance del Tc-99m acido dietilentriaminopentacetico (DTPA)

3. Metodo scintigrafico renale:

Determinazione del Tc-99m-DTPA all'interno del rene

1. Metodi che prevedono la raccolta delle urine

Clearance urinaria dell'inulina (gold standard)

La misurazione della clearance urinaria dell'inulina per la determinazione della GFR viene considerata il gold standard test, ovvero la metodica alla quale raffrontare qualsiasi altro test disponibile, sia in medicina umana che in medicina veterinaria^{4,14,18,19,24}.

L'inulina è un polimero del fruttosio che presenta caratteristiche tali da renderla un perfetto marker per la determinazione della GFR: viene filtrata liberamente a livello glomerulare e non viene riassorbita né secreta a livello tubulare^{4,14}, non forma legami proteici, non viene metabolizzata dall'organismo, non è soggetta ad accumulo renale e non influenza in nessun modo la GFR. È stata inoltre dimostrata la sua bassa tossicità che la rende un ottimo marker anche nel caso di utilizzo in pazienti nefropatici⁶.

Gli svantaggi legati alla determinazione della GFR mediante clearance urinaria dell'inulina sono una scarsa disponibilità del prodotto sul

mercato, commercializzato liberamente esclusivamente negli Usa, e una complessità della tecnica che la rende inutilizzabile nella pratica veterinaria: per l'esecuzione del test sono infatti necessarie l'applicazione di un catetere urinario, che predispone il soggetto a infezioni urinarie e a possibili lesioni uretrali, una raccolta accurata e completa delle urine a intervalli regolari in un lasso di tempo di 24 h e l'infusione continua del marker²⁴.

Attraverso la misurazione della concentrazione plasmatica e urinaria dell'inulina, è possibile calcolare la GFR, corrispondente alla clearance dell'inulina stessa, applicando tale formula:

$$C_{in} = U_{in} \times U_v / P_{in} \quad \text{dove:}$$

C_{in} = clearance dell'inulina

U_{in} = concentrazione urinaria dell'inulina

U_v = volume urinario

P_{in} = concentrazione plasmatica dell'inulina⁶

Mentre nel cane ad oggi la clearance urinaria dell'inulina rappresenta il gold standard test per la determinazione della GFR al quale qualsiasi test effettuato debba esser messo a confronto, nel gatto la clearance dell'inulina è stata sostituita nella sua funzione di gold standard test dalla clearance urinaria della creatinina esogena, che ne è stato dimostrato essere una valida alternativa^{18,25}.

Clearance urinaria della creatinina endogena

La creatinina è una sostanza fisiologicamente presente nell'organismo, prodotta costantemente dalla degradazione della creatina, molecola sintetizzata a livello epatico e accumulata a livello del tessuto muscolare scheletrico.

La creatinina è una molecola di piccole dimensioni (113 Da), solubile in acqua, trasportata nel circolo ematico in forma libera, liberamente filtrata a livello glomerulare e non riassorbita a livello tubulare⁴⁻¹⁴. A differenza del gatto, nell'uomo e nel cane la creatinina subisce una secrezione tubulare a livello del tubulo prossimale, comportando una lieve sovrastima della GFR, considerata comunque trascurabile vista la sua scarsa entità¹⁴⁻²⁶⁻²⁷⁻²⁸. Inoltre molti sono i fattori extrarenali, di natura non patologica, che possono influenzare la concentrazione plasmatica e urinaria di creatinina: età, stato di idratazione, peso, attività fisica, ritmi biologici, stagione, apporto proteico con la dieta.

La creatinina plasmatica e urinaria possono esser misurate mediante due metodologie: il metodo della Jaffe's reaction e il metodo enzimatico.

Nella Jaffe's reaction la creatinina viene messa a contatto con il reagente di Jaffe; dalla reazione fra i due componenti si forma un cromogeno giallo-arancio, in condizioni di pH alcalino.

La limitazione di tale tecnica risiede nel fatto che il reagente di Jaffe ha una scarsa specificità per la creatinina, reagendo con molte sostanze cromogene di varia natura (bilirubina, lipidi, acetoacetato, acetone e glucosio), definite "cromogeni non-creatinina"²⁹⁻³⁰. Poiché nelle urine non si riscontra la presenza di tali sostanze, l'interferenza delle stesse sui risultati relativi alla misurazione della concentrazione urinaria della creatinina risulta trascurabile³⁰. Nel caso della misurazione della

concentrazione di creatinina plasmatica invece l'influenza di tali cromogeni sulla reazione può causare una sovrastima, determinando conseguentemente una sottostima della GFR⁴⁻¹⁵.

Il metodo enzimatico, mediante reazione della creatinina con creatinina aminoidrolasi o creatinina iminoidrolasi, il cui utilizzo nel cane e nel gatto non è stato ancora confermato, è stato dimostrato essere nell'uomo un metodo più efficace e più accurato per la determinazione della concentrazione di creatinina plasmatica³¹⁻³².

Poiché nel gatto la creatinina endogena prodotta dal metabolismo muscolare viene esclusivamente e completamente filtrata a livello glomerulare, senza subire né riassorbimento né secrezione a livello tubulare³³, assumendo quindi che la clearance urinaria della creatinina possa esser considerata uguale alla GFR, il test di valutazione della clearance urinaria della creatinina endogena può rappresentare una valida alternativa per la determinazione della GFR.

L'esame prevede tempi di attesa brevi che rendono la tecnica più facilmente applicabile ai pazienti felini: il test ha infatti una durata di 60'. L'animale deve esser libero di bere, con disponibilità di acqua ad libitum e deve esser regolarmente alimentato.

Viene applicato all'animale un catetere urinario, lasciato in situ per tutta la durata della procedura, attraverso il quale si procede ad un completo svuotamento della vescica, delicatamente con una siringa da 20 ml. L'applicazione del catetere può predisporre il soggetto a infezioni urinarie e causare lesioni iatrogene a carico delle basse vie urinarie. Un'aspirazione troppo forzata può causare l'aspirazione della mucosa vescicale, determinando l'insorgenza di eventuali traumi o impedendo il completo svuotamento della vescica. Assicuratisi che lo svuotamento della vescica è stato completo, si procede con il

risciacquo della stessa mediante iniezione e successiva aspirazione di 5-20 ml di soluzione fisiologica, ripetuta per almeno 3 volte³⁰.

Dopo 30' viene effettuato un prelievo ematico dalla vena giugulare di 5 ml di sangue, per ottenere la stima della concentrazione plasmatica della creatinina. Trascorsi 30' dal prelievo ematico si procede alla raccolta completa delle urine presenti in vescica attraverso il catetere urinario applicato.

Il campione di sangue viene centrifugato per 15' a 1600 rpm.

La concentrazione di creatinina nel campione sierologico viene analizzata mediante il metodo Folin-WU.

Attraverso la seguente relazione si definisce la clearance della creatinina endogena, corrispondente alla GFR:

$$C_{cr} = U_{cr} \times V / S_{cr} \quad \text{dove:}$$

C_{cr} = clearance della creatinina endogena (ml/min)

U_{cr} = concentrazione urinaria della creatinina (mg/ml)

V = flusso di urine prodotte in ml/min (ml/min)

S_{cr} = concentrazione sierica della creatinina (mg/ml)¹⁴⁻³⁰

Sono stati individuati sia in gatti sani che in gatti nefropatici con insufficienza renale i valori medi di GFR ottenuti mediante clearance della creatinina endogena, pari rispettivamente a 2,64 ml/min/kg \pm 0,22 e 0,79 \pm 0,41³⁴.

Clearance urinaria della creatinina esogena

La determinazione della GFR mediante la valutazione della clearance urinaria della creatinina esogena, nonostante per l'eccessiva laboriosità della metodica di esecuzione non trovi applicabilità nella pratica clinica, rappresenta per il gatto il gold standard test¹⁸. Fornisce infatti una misura accurata della GFR sia in gatti sani che in gatti con insufficienza renale, paragonabile ai risultati ottenuti mediante la misurazione della clearance dell'inulina³⁰⁻³⁵⁻³⁶.

Tale metodica permette di arginare l'errore generato dai cromogeni non-creatinina che influenzano negativamente la Jaffe's reaction: la concentrazione di creatinina è talmente elevata che tali sostanze vengono diluite fino a una quantità trascurabile che non ha alcuna influenza sulla determinazione della concentrazione plasmatica di creatinina⁴⁻³⁰.

Il test si basa sulla determinazione della clearance della creatinina esogena, somministrata in infusione continua, mediante la misurazione della sua concentrazione plasmatica ed urinaria. Vi deve esser la disponibilità di acqua ad libitum durante tutta la procedura, mentre l'alimentazione deve esser cessata cosicché sia garantito il digiuno da circa 16-20 ore al momento dell'esecuzione dell'esame.

Dopo aver anestetizzato il paziente, viene applicata un'agocannula a livello della vena cefalica dalla quale viene effettuato un prelievo ematico che verrà utilizzato come campione basale di creatinina plasmatica. Una seconda agocannula viene poi posizionata a livello della vena giugulare e rimarrà in sede per tutta la durata dell'esame.

Mediante una sonda naso-gastrica, prima dell'inoculazione della creatinina, viene somministrata al paziente una quantità di acqua pari

al 3% del suo peso corporeo: per un gatto di 3 kg, ad esempio, si procede alla somministrazione di 90 ml di acqua.

Viene infine applicato un catetere urinario attraverso il quale si provvederà allo svuotamento della vescica e ai vari prelievi di urina nei tempi stabiliti.

Tramite l'agocannula posizionata a livello della vena cefalica vengono somministrati in bolo 30-60 mg/kg di creatinina, a seconda della gravità del danno renale che si sospetta nel paziente, e si procede ad annotare l'orario di inoculazione, considerato come tempo 0 (t_0).

L'animale viene tenuto in infusione continua di soluzione di creatinina (3,2 mg/kg) a un dosaggio di 16 mg/kg/h, in modo da mantenere una concentrazione plasmatica costante > 6 mg/dl di creatinina.

Dopo 60' dal primo bolo di creatinina esogena vengono effettuati 3 prelievi di urina a distanza di 30' l'uno dall'altro (ai tempi 60', 90', 120').

Dall'agocannula posizionata a livello della giugulare si procede invece al prelievo di campioni ematici, effettuati a 90', 120', 150', 180' dall'inoculazione del primo bolo al t_0 , i quali verranno posizionati in provette contenenti eparina.

La concentrazione plasmatica e urinaria della creatinina esogena viene calcolata mediante il metodo della Jaffe's reaction, attuato con un analizzatore semiautomatico.

Acquisiti i valori della concentrazione plasmatica di creatinina, viene effettuata una media degli stessi nei periodi di tempo 90'-120', 120'-150' e 150'-180', ottenendo così tre valori di creatinina plasmatica.

La determinazione della creatinina plasmatica e della creatinina urinaria ci permette di calcolare la clearance della creatinina esogena e conseguentemente della GFR applicando tale formula:

$$C_{cr} = U_{cr} \times V / P_{cr}$$

dove:

C_{cr} = Clearance della creatinina esogena (ml/min)

U_{cr} = Concentrazione urinaria della creatinina esogena (mg/ml)

V = flusso delle urine (ml/min)

P_{cr} = concentrazione plasmatica della creatinina esogena (mg/ml)

È molto importante garantire un adeguato stato di idratazione del paziente durante le metodiche per la determinazione della GFR che prevedono la misurazione della clearance di un marker renale, poiché così come è stato dimostrato da uno studio sul cane³⁷, anche nel gatto è presumibile pensare che alterazioni dello stato di idratazione potrebbero influenzare i valori della GFR.

Tabella 5: effetti dei vari stati di idratazione (disidratazione, normale idratazione e iperidratazione) sulla GFR in cani clinicamente normali

Metodo	Stato di idratazione	Clearance (ml/min/kg ± SE)
Creatinina esogena	Sovraccarico di fluidi	4,14 ± 0,20
	Normalità	3,64 ± 0,10
	Disidratazione	2,78 ± 0,06
Creatinina endogena	Sovraccarico di fluidi	2,94 ± 0,12
	Normalità	2,66 ± 0,14
	Disidratazione	2,15 ± 0,09

2. Metodi che prevedono la valutazione del decadimento plasmatico di una sostanza

Clearance plasmatica dell'inulina in singola iniezione

La determinazione della GFR mediante la misurazione della clearance plasmatica dell'inulina in singola iniezione rappresenta nei piccoli animali e in particolare nel gatto un'allettante alternativa ai metodi più indaginosi che prevedono la raccolta delle urine, quali la clearance della creatinina endogena o esogena.

La validità di tale test è stata dimostrata in uno studio nel quale è stata comparata la clearance plasmatica dell'inulina con la clearance urinaria della creatinina esogena in gatti sani e nefrectomizzati, dal quale è emerso che la clearance plasmatica dell'inulina in singola iniezione presenta una specificità pari a quella riscontrata mediante la clearance urinaria della creatinina esogena (98%) e una sensibilità nettamente superiore, pari al 100% contro il 95% del gold standard test preso in esame³⁵.

È una tecnica che si basa sulla valutazione del decadimento progressivo della concentrazione plasmatica di inulina nel tempo, dando una stima esclusivamente riguardo la clearance plasmatica dell'inulina, trascurando l'eliminazione della sostanza con le urine e necessitando quindi di soli campioni ematici.

È necessario sospendere l'alimentazione dell'animale circa 12 ore prima dall'esecuzione del test, mentre è importante lasciare libero accesso al paziente a una fonte di acqua, che deve esser disponibile ad libitum.

Vengono posizionate due agocannule a livello delle vene cefaliche sx e dx. Da una delle due agocannule si effettua un primo prelievo ematico che rappresenta il campione ematico basale, al tempo 0 (t_0).

Nell'agocannula controlaterale viene inoculata in unico bolo una soluzione di inulina al 25% (Inutest®) al dosaggio di 3000 mg/m² di superficie corporea.

Dopo l'inoculazione dell'inulina vengono effettuati in successione una serie di campionamenti ematici, prelevando per ognuno circa 1,5 ml di sangue dall'agocannula dalla quale è stato effettuato il campionamento basale, ai tempi 3'-10'-20'-40'-80'-120'-180'.

I campioni ematici ottenuti vengono lasciati coagulare e sottoposti a centrifugazione. Se non è prevista un'analisi immediata del siero, è possibile congelare i campioni a una temperatura di -20°C fino al momento del loro utilizzo.

L'inulina viene scissa, mediante una reazione di idrolisi acida in monomeri di D-Fruttosio, il cui dosaggio viene analizzato attraverso un kit commerciale specifico per il dosaggio enzimatico del D-Fruttosio, disponibile in commercio.

È necessario un quantitativo di siero o plasma non inferiore a 100 µl per effettuare l'esame, il quale può rilevare concentrazioni di inulina comprese fra 5 e 2000 mg/l.

Analizzando i campioni prelevati in successione nel tempo è possibile ricostruire il decadimento sierico dell'inulina, attraverso il quale mediante un programma informatico (INUSOFT®) è possibile calcolare la GFR. Il modello cinetico utilizzato per i calcoli effettuati è un modello bi-compartimentale, che fornisce un'ottima descrizione della curva concentrazione/tempo dell'inulina³⁸, come dimostrato anche in uno studio effettuato sull'uomo³⁹.

È stata studiata una metodica semplificata relativa alla determinazione della clearance dell'inulina in singola iniezione, una sorta di test di escrezione dell'inulina, che prevede dopo tre ore dall'inoculazione in bolo di inulina (3000 mg/m²) l'esecuzione di un solo prelievo di sangue.

Uno studio effettuato sul gatto ha mostrato delle perplessità riguardo la validità della misurazione della clearance plasmatica di inulina in singola iniezione, legate alla scarsa correlazione fra i risultati ottenuti da tale metodica e quelli ottenuti invece tramite clearance della creatinina esogena³⁶. Queste perplessità potrebbero trovare risposta nel fatto che in tale studio sono stati presi in esame solo gatti clinicamente sani. I risultati ottenuti in seguito, prendendo in esame anche soggetti con problemi renali, hanno infatti dimostrato che la clearance dell'inulina in singola iniezione dà una stima realistica della GFR e rappresenta perciò una valida alternativa³⁸⁻⁴⁰.

Poiché la concentrazione plasmatica di inulina sembra esser influenzata da elevate concentrazioni di glucosio nel sangue e da alterazione del volume dei fluidi extracellulari, sono necessarie ulteriori indagini per valutare la sua validità per la determinazione della GFR in gatti affetti da diabete mellito o che presentano uno stato di disidratazione o ipovolemia³⁵.

Clearance dello ioexolo

Una metodica competitiva nei confronti della clearance dell'inulina per la determinazione della GFR è il test di valutazione della clearance dello ioexolo, il quale si basa sulla misurazione della clearance plasmatica dello ioexolo ottenuta dividendo la dose inoculata di analita per l'area sottostante la curva concentrazione/tempo (AUC)³⁵.

La sua efficacia come marker renale è stata dimostrata in numerose specie: uomo¹⁴⁻⁴¹, cane⁴⁻¹⁹⁻²⁴⁻²⁵, gatto⁴⁻²⁰⁻²⁴⁻²⁵⁻⁴², suino⁴³, cavallo⁴⁴, pecora⁴⁵.

Lo ioexolo è un mezzo di contrasto non ionico, con peso molecolare di 821 Da, a bassa osmolarità. La molecola si distribuisce uniformemente negli spazi extracellulari, non subisce processi di metabolizzazione e quasi il 100% della sostanza, potendo considerare trascurabile la minima percentuale escreta per mezzo di altre vie, viene eliminato per via urinaria in 24 h di tempo dall'iniezione endovenosa del farmaco²⁴. La maggior parte dello ioexolo inoculato si trova in forma libera nel sangue e solo il 2% di esso viene trasportato legato alle proteine plasmatiche¹⁴.

La sua elevata stabilità nel sangue permette una più facile gestione dei campioni prelevati e la possibilità di inviare tali campioni a un laboratorio esterno per effettuare le analisi²⁰.

Caratteristica importante che rende lo ioexolo un ottimo marker renale è anche la sua sicurezza: mentre nell'uomo è stata riscontrata una certa tossicità, con un'incidenza comunque molto bassa dello 0,04% secondo uno studio effettuato su larga scala⁴⁶, numerosi studi nei quali lo ioexolo è stato utilizzato come marker renale per la determinazione della GFR nel cane e nel gatto hanno dimostrato l'assenza di reazioni avverse immediate o tardive in tali specie²⁰.

Essendo un mezzo di contrasto normalmente utilizzato in medicina umana, è inoltre facilmente reperibile in commercio a basso costo, sotto forma di soluzione acquosa iniettabile per somministrazione endovenosa (Omnipaque®), contenente i due isomeri endo- e eso-ioexolo²⁰⁻⁴².

La determinazione della GFR mediante la misurazione della clearance dello ioexolo si basa sull'inoculazione di tale analita per via endovenosa e sulla rilevazione della sua concentrazione plasmatica, ottenuta mediante prelievi seriali.

Molti sono gli studi ancora oggi in atto per valutare il metodo migliore per la determinazione della GFR mediante clearance dello ioexolo, che garantisca accuratezza, buona sensibilità e specificità con il minor numero di prelievi ematici possibili.

Gli studi più recenti sono volti a valutare la possibilità di adottare un metodo semplificato ad un unico campionamento per la determinazione della GFR mediante clearance dello ioexolo sia nel cane che nel gatto: i tempi considerati migliori per il campionamento dopo l'inoculazione dell'analita sono 120' per il cane e 80'-90' per il gatto²⁴⁻⁴⁷.

La concentrazione plasmatica di ioexolo può esser rilevata nel gatto mediante diverse metodologie: reazione colorimetrica, cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), X-ray fluorescence (XRF), elettroforesi capillare, spettrometria di emissione su plasma (ICP)⁴².

Ciascuna di queste tecniche ha vantaggi e svantaggi legati alla necessità di campioni più o meno abbondanti, tempi di prelievo più o meno lunghi, maggiore o minor accuratezza.

Frequentemente viene, ad esempio, utilizzata la misurazione della concentrazione plasmatica dello ioexolo mediante reazione colorimetrica: questa ha il vantaggio di richiedere il prelievo di un piccolo quantitativo di plasma (50 µl) perché il test abbia validità, ma necessita di un dosaggio di ioexolo che garantisca una concentrazione plasmatica di iodio compresa fra 10 e 120 µg/kg, ottenibile inoculando

in bolo 90 mg/kg di ioexolo in gatti clinicamente sani e 45 mg/kg in gatti con patologie renali⁴²⁻⁴⁸.

Il metodo XRF è una tecnica molto accurata e di semplice esecuzione, ma richiede un dosaggio di ioexolo molto alto (300 mg di iodio/kg) e la raccolta di un volume di plasma elevato, con un quantitativo minimo per campione di 3 ml di plasma²⁴.

L'HPLC è ad oggi la tecnica più comunemente utilizzata per la determinazione della concentrazione plasmatica dello ioexolo, permettendo di valutare la concentrazione di entrambi i suoi isomeri, endo- ed eso-ioexolo. Molti studi hanno dimostrato una buona sensibilità, specificità, accuratezza e riproducibilità di tale tecnica¹⁸.

La clearance dello iodio viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$C_i = \text{dose di ioexolo} / \text{AUC}$ dove:

C_i = clearance dello iodio

AUC = area sotto la curva di decadimento plasmatico dello iodio

Per ottenere l'AUC possono essere utilizzati i modelli farmacocinetici bi-compartmentale, non-compartmentale e mono-compartmentale¹⁹⁻²⁴⁻²⁵⁻⁴²⁻⁴⁸. I primi due modelli hanno il vantaggio di dare una stima più precisa dell'AUC e di conseguenza fanno sì che si ottengano risultati di GFR più accurati, ma necessitano di un numero di campioni elevato che rende più difficile l'esecuzione della tecnica.

Il modello mono-compartmentale al contrario presenta una notevole semplicità richiedendo un numero ridotto di campionamenti per poter

ottenere l'AUC ma tende a sottostimare i valori di GFR ottenuti. Per questo in molti studi che si avvalgono del modello farmacocinetico mono-compartmentale viene adottato un metodo di correzione che prevede l'utilizzo della formula di Brøchner-Mortensen⁴⁹, formula correttiva utilizzata abitualmente in medicina umana⁵⁰⁻⁵¹ e trasposta anche a studi effettuati sul cane e sul gatto²⁴⁻⁴²⁻⁴⁸⁻⁵², la cui validità in specie diverse dall'uomo non è stata però confermata: uno studio ha dimostrato che tale formula non è valida nel caso di cani di taglia compresa fra 2 e 6 kg¹⁹.

Una volta ottenuta la clearance dello iodio viene calcolata la clearance dello ioexolo mediante tale formula:

$$PC_{io} = (0,990778 \times C_i) - (0,001218 \times C_i) \quad \text{dove:}$$

PC_{io} = clearance plasmatica dello ioexolo

C_i = clearance plasmatica dello iodio

Clearance del Tc 99m acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA)

La determinazione della GFR mediante valutazione del decadimento plasmatico del Tc-99m-DTPA è stata largamente studiata e confermata sia nell'uomo che nel cane⁵³⁻⁵⁴ e risulta esser applicabile anche al gatto.

Il Tc-99m-DTPA è un mezzo di contrasto, utilizzato frequentemente nella diagnostica per immagini relativamente all'apparato urinario, che presenta specifiche caratteristiche che lo rendono un valido marker renale, ottimo per lo studio di valutazione della GFR.

La molecola viene infatti completamente filtrata a livello del glomerulo renale, senza subire alcun processo di riassorbimento o secrezione lungo il nefrone, non viene metabolizzata o sintetizzata dall'organismo e non presenta un legame significativo con le proteine plasmatiche.

Il composto viene eliminato con un'emivita media di 6 ore dall'inoculazione dello stesso nel sangue.

Ulteriore vantaggio è dato dalla disponibilità del prodotto in commercio, facilmente reperibile sul mercato, e da un rischio radioattivo trascurabile, dovuto alle basse dosi di analita richieste per il test di valutazione della GFR⁵⁵⁻⁵⁶.

La metodica che utilizza il Tc-99m-DTPA per la valutazione della GFR prevede l'iniezione endovenosa dell'analita in unico bolo: la tecnica non prevede quindi la raccolta di campioni seriali di urine, notevole vantaggio pratico.

Il gatto deve esser tenuto a digiuno per almeno 12 ore prima dell'esecuzione del test, mentre non sono richieste particolari restrizioni riguardo il consumo di acqua. Viene effettuata un'anestesia generale, dopo la quale viene applicata un'agocannula a livello della vena safena mediale, utilizzata per l'inoculazione endovenosa del Tc-99m-DTPA e per la fluidoterapia. A livello della giugulare viene posizionata una seconda agocannula per il prelievo dei campioni ematici.

Per prima cosa viene effettuato un prelievo ematico per la raccolta del campione basale; successivamente viene inoculato un volume di fluidi, solitamente soluzione fisiologica, pari al 3% del peso corporeo dell'animale. Tramite la stessa agocannula dalla quale sono stati inoculati i fluidi, viene somministrato il Tc-99m-DTPA in unico bolo al

dosaggio di $0,91 \pm 0,11$ mCi e viene poi registrato l'orario esatto di inoculazione dell'analita, corrispondente al tempo 0 (t_0).

Una volta inoculato il Tc-99m-DTPA la siringa viene sottoposta a osservazione mediante rilevatore gamma per valutare la radioattività residua. Il valore di radioattività residua rilevato verrà sottratto alla dose iniziale del mezzo di contrasto, in modo da ottenere la quantità precisa di analita inoculata.

La curva di decadimento plasmatico del Tc-99m-DTPA può essere ottenuta con due diverse metodiche di campionamento: la prima (DTPA-1) prevede il prelievo di 3 campioni ematici, rispettivamente ai tempi 60'-120' e 180' dall'inoculazione dell'analita; la seconda metodica (DTPA-2) necessita invece di un solo campionamento prelevato al tempo 60' dalla somministrazione del Tc-99m-DTPA.

Studi di correlazione effettuati fra le due metodiche e il gold standard test, rappresentato dalla clearance urinaria della creatinina esogena, dimostrano una miglior correlazione del DTPA-1 ($p < 0,05$) con il gold standard test rispetto al DTPA-2 ($p < 0,1$) e un'ottima correlazione fra DTPA-1 e DTPA-2 ($p < 0,05$)³⁶.

3. Metodo scintigrafico renale

Determinazione del Tc-99m-acido dietilenetriaminopentacetico (DTPA) nel rene mediante metodo scintigrafico

È un metodo non invasivo utilizzato per la determinazione della GFR nel gatto, la cui accuratezza è paragonabile a quella dei metodi considerati i "gold standard test" (clearance urinaria dell'inulina e clearance urinaria della creatinina esogena).

Il metodo scintigrafico viene utilizzato in medicina veterinaria per vari scopi fra cui la valutazione della morfologia renale e l'evidenziazione di eventuali uropatie ostruttive, e la valutazione della funzionalità renale, in particolare in caso di trapianto renale.

Mentre le tecniche standard utilizzate solitamente per la determinazione della GFR danno una stima generica della funzionalità renale globale, il metodo scintigrafico è l'unica tecnica ad oggi conosciuta che permette di misurare non solo la funzionalità renale globale ma anche la funzionalità individuale di un singolo rene⁵⁷⁻⁵⁸.

Il metodo risulta esser molto accurato, più rapido rispetto ad altri normalmente utilizzati per la determinazione della GFR, di più facile esecuzione non richiedendo la raccolta di campioni ematici o urinari. Lo svantaggio principale è rappresentato però dall'utilizzo di isotopi radioattivi per i quali sono richiesti tempi di isolamento del paziente dopo l'inoculazione del marker molto lunghi per garantirne lo smaltimento, attrezzatura e strumentazione specifiche e personale altamente specializzato per l'esecuzione di tale tecnica.

Il Tc-99m-DTPA presenta tutte le caratteristiche del marker renale ideale: viene liberamente filtrato a livello glomerulare senza subire riassorbimento o secrezione tubulare, non viene metabolizzato all'interno dell'organismo e non si lega con le proteine plasmatiche.

La GFR viene calcolata attraverso la determinazione della quantità di isotopo (Tc-99m-DTPA) filtrato dal rene, attraverso l'elaborazione di immagini mediante un computer.

Prima dell'esecuzione del test, la siringa contenente l'isotopo viene posta 26 cm al di sopra del detector esterno di radioattività (camera gamma), per determinare la quantità effettiva di marker presente, dato che verrà registrato.

Il paziente viene posto, dopo sedazione, in decubito laterale sinistro e la camera gamma viene posizionata dorsalmente ai reni.

Attraverso un'agocannula posizionata a livello venoso periferico, vengono inoculati per via endovenosa 3-4 mCi di Tc-99m-DTPA procedendo, contemporaneamente alla somministrazione dell'isotopo, alla raccolta di immagini. Le immagini vengono raccolte con un intervallo di tempo di 6 secondi l'una dall'altra, per ottenere una registrazione complessiva di 3 minuti.

Successivamente all'inoculazione del marker, la siringa utilizzata per la sua somministrazione viene nuovamente posta a 26 cm dalla camera gamma, per determinare la quantità di Tc-99m-DTPA effettivamente inoculata.

Per l'analisi, vengono presi in considerazione i dati ottenuti in circa 2 minuti, nell'intervallo di tempo compreso fra i 60 e i 180 secondi. Il radiologo provvede ad analizzare le immagini, circoscrivendo l'area di interesse intorno ai reni e prendendo in considerazione anche un'area periferica, avendo l'accuratezza di non comprendervi milza, ureteri ed aorta. La determinazione della quantità di isotopo liberamente filtrato dal rene nel tempo viene ottenuta per via computerizzata mediante l'utilizzo di formule specifiche.

Il metodo scintigrafico permette di ottenere una curva della concentrazione dell'isotopo nel tempo, la cui pendenza inizia ad aumentare a 15-30 secondi dall'inoculazione fino al raggiungimento, per accumulo nei nefroni, di un picco massimo di concentrazione a 2,5-3,5 minuti dalla somministrazione dell'isotopo. Mentre nei soggetti clinicamente sani la concentrazione tende poi progressivamente a decrescere, nei soggetti nefropatici la curva concentrazione-tempo rimane costantemente piatta⁵⁸.

Tabella 6: Vantaggi e svantaggi delle diverse metodiche utilizzate per la determinazione della GFR nel gatto

Metodologia	Vantaggi	Svantaggi
Clearance urinaria dell'inulina	<ul style="list-style-type: none"> • Gold standard test 	<ul style="list-style-type: none"> • Non facilmente reperibile in commercio • Richiede campioni urinari • Scarsa disponibilità di laboratori che eseguano le analisi • Costo elevato
Clearance urinaria della creatinina endogena	<ul style="list-style-type: none"> • Non necessita della somministrazione di farmaci/sostanze esogene • Non richiede particolari sistemi di rilevamento e calcolo 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede la raccolta completa delle urine nelle 24 h • Possibilità di dislocazione del catetere urinario, infezioni urinarie, fuoriuscita di urina all'esterno del catetere • Necessità di laboratori specializzati per l'esecuzione del test (i sistemi di rilevamento ad uso ambulatoriale sottostimano la concentrazione di creatinina • Necessità di refrigerare le urine
Clearance urinaria della creatinina esogena	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizzato come "gold standard test " nel gatto • Misurazioni facilmente disponibili • Calcoli matematici semplici 	<ul style="list-style-type: none"> • Mancata disponibilità in commercio di creatinina sotto forma di soluzione iniettabile endovenosa • Necessità della raccolta completa delle urine (gabbia metabolica o catetere permanente) • Necessità di sedazione per mantenere in situ il catetere • Necessità di prelievi ematici e urinari a precisi intervalli di tempo • Sconsigliato in animali in stato di lieve azotemia o uremia
Clearance plasmatica dell'inulina in singola iniezione	<ul style="list-style-type: none"> • Non richiede la raccolta di urine • Valida alternativa al "gold standard test" 	<ul style="list-style-type: none"> • Scarsa disponibilità in commercio dell'analita • Costo elevato • Eccessiva complessità di esecuzione

Clearance plasmatica dello ioexolo	<ul style="list-style-type: none"> • Facilmente reperibile in commercio in forma iniettabile • Non richiede la raccolta di urine • Non necessita di anestesia/sedazione • Possibilità dell'animale di abbeverarsi e alimentarsi durante l'esecuzione del test • Elevata stabilità: possibilità di congelare i campioni e inviarli a laboratori specializzati 	<ul style="list-style-type: none"> • Prelievi ematici a precisi intervalli di tempo • Necessità di un metodo di calcolo accurato per ottenere l'AUC
Clearance plasmatica del Tc-99m- DTPA	<ul style="list-style-type: none"> • Facilmente reperibile in commercio • Non richiede la raccolta di urine • Richiede basse dosi di radioattività che limitano il rischio di radiazioni • Dà una stima sia della funzionalità renale globale sia della funzionalità di un singolo rene 	<ul style="list-style-type: none"> • Sono necessari una licenza specifica e una strumentazione specializzata • Richiede l'isolamento del paziente per le 24 h successive all'esecuzione del test
Metodo scintigrafico	<ul style="list-style-type: none"> • Non richiede la raccolta di campioni urinari ed ematici • Dà una stima della funzionalità renale globale e individuale 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessita di particolari autorizzazioni e di una strumentazione specializzata • Richiede l'isolamento del paziente per le 24 h successive l'esecuzione del test

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare metodi semplificati per la determinazione della GFR nel gatto attraverso la misurazione della clearance plasmatica dello ioexolo.

MATERIALI E METODI

Materiali

Le soluzioni iniettabili di ioexolo e di iopentolo, sotto la denominazione commerciale rispettivamente di Omnipaque® 300 (300 mgI/ml) e Imagopaque® 300 (300 mgI/ml), sono state fornite dall'azienda Nycomed Amersham Sorin, Milano, Italia.

Tutti i solventi utilizzati sono di grado HPLC (Baker Analyzed® Reagent, J.T.Baker, Deventer, Holland).

L'acqua, di grado analitico, utilizzata per portare a concentrazione la fase mobile in HPLC, è stata prefiltrata mediante filtri d'aceto di cellulosa impermeabilizzati con silicone (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti gli altri reagenti sono provenienti dalle più comuni fonti commerciali.

Strumentazione

L'analisi dei campioni è stata effettuata tramite un sistema HPLC dotato di una pompa a gradiente binario SpectraSYSTEM® P2000 Thermo Finnigan, un rilevatore UV-VIS SpectraSYSTEM® 3000 Thermo Finnigan ed un auto campionatore SpectraSYSTEM® AS 3000 Thermo Finnigan (Waltham, MA, USA).

Sono state utilizzate una colonna cromatografica Waters SunFire®, di dimensioni 250x4,60 mm, avente una granulometria delle particelle di 5 µm e una precolonna Waters Guard-Pack™ (Waters, Milford, MA, USA) impaccate con gel di silice derivatizzato con gruppi alchilici C18.

È stato adottato un volume di iniezione di 100 μ m.

Soluzioni standard e soluzioni stock

Dalla soluzione acquosa in commercio Omnipaque® 300 mg/ml contenente 64,7 mg/ml di ioexolo è stata ottenuta una soluzione madre alla concentrazione di 2 mg/ml. Dalla soluzione madre, per diluizioni progressive, sono state ottenute le soluzioni standard di ioexolo a concentrazioni di 5, 10, 25, 50, 100 e 200 μ g/ml da cui è stata ottenuta la taratura per l'iniezione di 100 μ l nel sistema HPLC.

Dalla soluzione acquosa in commercio Imagopaque® 300 mg/ml contenente 658 mg/ml di iopentolo è stata ottenuta una soluzione madre alla concentrazione di 2 mg/ml, dalla quale per diluizioni successive si sono ottenute le soluzioni standard a concentrazione 5, 10, 15, 50, 100 e 200 μ g/ml. Le soluzioni di ioexolo e iopentolo così ottenute sono state conservate a una temperatura di 4°C al riparo dalla luce. I due isomeri costituenti le soluzioni di ioexolo e di iopentolo presentano tempi di reazione diversi in HPLC: per questo è stato preso in riferimento il picco corrispondente all'isomero più abbondante.

Standard interno

La scelta di una sostanza come standard interno dipende da specifiche caratteristiche della stessa: la sua totale assenza nella miscela da analizzare; la sua incapacità di reagire con tutti i componenti del campione; l'assenza di impurezze rilevabili all'interno della stessa; la similarità strutturale e di solubilità alla sostanza in questione.

Come soluzione standard interna per lo ioexolo è stato selezionato lo iopentolo, anch'esso mezzo di contrasto non ionico disponibile in soluzione acquosa, che differisce strutturalmente dallo ioexolo esclusivamente per la presenza di un gruppo metossilico.

Condizioni cromatografiche

Le condizioni cromatografiche utilizzate sono le seguenti: come fase mobile è stata utilizzata una miscela costituita da acqua a pH 2,6 e acetonitrile in rapporto di 94/6 % v/v. Precedentemente alla formulazione della fase mobile l'acqua è stata portata a pH idoneo per la colonna utilizzata corrispondente a 2,6 grazie all'aggiunta di H_3PO_4 all'85%. È stato utilizzato un flusso pari a 1,3 ml/min. La fase mobile è stata degassata sotto flusso di azoto. Ogni qual volta che la fase mobile terminava veniva sostituita con la nuova, attendendo che le condizioni della colonna tornassero in equilibrio, prima di procedere con le analisi.

Curve di calibrazione

Le soluzioni standard di ioexolo e iopentolo precedentemente preparate sono state iniettate, ottenendo così da queste, nelle condizioni cromatografiche sopra riportate, le rette di taratura dello ioexolo e dello iopentolo. Il tutto è stato ottenuto iniettando ciascuna soluzione per tre volte e ottenendo, tramite l'utilizzo della media delle tre determinazioni, l'equazione della retta di calibrazione al computer tramite il programma Graph Pad Prism® (Graph Pad Software Inc., IL, USA).

Come parametro quantitativo è stata impiegata l'area sottesa ai picchi del tracciato cromatografico, misurata direttamente dal software di integrazione ChromQuest 4.2 (Thermo Finnigan, Waltham, MA, USA). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism® 4 per Macintosh, USA.

Trattamento degli animali

La valutazione della clearance dello ioexolo è stata applicata a 53 gatti di privati di differente razza, sesso, età e peso, presentatisi presso l'Ospedale universitario veterinario "Mario Modenato" fra Dicembre 2008 e Dicembre 2010.

Di questi: 39, presentatisi per un controllo annuale, sono risultati sani dal punto di vista clinico e non mostravano segni di poliuria/polidipsia(PU/PD); 14 gatti si sono invece presentati per consulto nefrologico con segni di PU/PD da circa due mesi, dimagrimento e valori di creatinina plasmatica $> 1,6$ mg/dl.

Ottenuto il consenso informato dei proprietari, i pazienti sono stati sottoposti a visita clinica e a esami ematologici. Per ciascun paziente sono state compilate una cartella clinica, una scheda di accompagnamento e sono stati eseguite una serie di indagini diagnostiche ematologiche volte a valutare la funzionalità renale.

Figura 4: Scheda di accompagnamento per la determinazione della GFR, utilizzata all'interno dell'Ospedale didattico veterinario "M.Modenato".

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE SEZIONE DI NEFROLOGIA E UROLOGIA OSPEDALE DIDATTICO VETERINARIO "MARIO MODENATO" FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA UNIVERSITA' DI PISA	
TEST DI VALUTAZIONE DELLA GLOMERULAR FILTRATION RATE (GFR) MEDIANTE CLEARANCE PLASMATICA DELLO IOEXOLO	
CARTELLA CLINICA _____	
RAZZA: _____	
ETA': _____	
PESO: _____	
TERAPIA: _____	
PESO SIRINGA VUOTA:	
PESO SIRINGA PIENA:	
PESO SIRINGA POST-INOCULAZIONE:	
TEMPI DI PRELIEVO	
0'	
5'	
30'	

Tabella 7: Esami ematologici svolti per la valutazione della funzionalità renale nei pazienti presi in esame.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Emocromo= WBC, RBC, Hct, Hb• Urea e creatinina plasmatica• Calcio totale e Calcio ione• Fosforo• Albumina• Proteine totali |
|---|

I pazienti sono stati suddivisi in base alla concentrazione di creatinina plasmatica ($> 1,6$ mg/dl) e alla presenza di PU/PD in due gruppi: gatti clinicamente sani (HC), in numero di 39, e gatti con insufficienza renale cronica (CKD), in numero di 14. I gatti sono stati ricoverati in struttura per 12 ore in modo da concludere tutte le indagini diagnostiche ematologiche in atto e si è proceduto poi a sottoporre i singoli pazienti al test di valutazione della GFR, secondo la procedura descritta di seguito.

Nel paziente sveglio sono state posizionate due agocannule a livello della vena cefalica destra e sinistra. Da una delle due agocannule si è provveduto a prelevare tramite una siringa da 2,5 ml un volume di sangue non inferiore a 0,5 ml che è servito da campione basale (t_0). Il sangue prelevato, una volta tolto l'ago alla siringa, è stato posto in una provetta eparinizzata, la quale è stata agitata per consentire una omogenea distribuzione della sostanza anticoagulante all'interno del campione, evitando così la formazione di coaguli. Questa manovra è stata ripetuta per tutti i prelievi del caso.

Previa pesatura accurata del paziente mediante bilancia, è stata preparata la dose di ioexolo da somministrare, pari a 64,7 mg/kg,

mediante una siringa di adeguate dimensioni. È importante pesare consequenzialmente la siringa, tramite apposita bilancia, prima della preparazione dello ioexolo (peso della siringa vuota), dopo la preparazione del mezzo di contrasto (peso pre-inoculazione) e dopo l'iniezione dello stesso (peso post-inoculazione), in modo da ottenere la dose esatta iniettata per differenza fra il peso della siringa prima e dopo l'iniezione.

Lo ioexolo così preparato è stato conservato al riparo dalla luce (avvolgendo per esempio la siringa con carta stagnola) fino al momento dell'iniezione, che è avvenuta per inserimento dell'ago della siringa nell'agocannula e iniettando il fluido in circa 60".

Considerando come tempo 0 (t_0) il momento di inoculazione dello ioexolo, sono stati programmati prelievi dall'agocannula della vena cefalica controlaterale rispetto a quella dove è stato iniettato lo ioexolo. Poiché l'agocannula spesso tende ad ostruirsi rapidamente è utile, in tal caso, effettuare un flushing con circa 2 ml di soluzione fisiologica; altrimenti è possibile ricorrere ad un prelievo di sangue tramite la vena giugulare.

Il paziente è stato sottoposto a 11 prelievi ematici (0,5 ml) a intervalli di tempo prestabiliti: 5'-15'-30'-45'-60'- 90'- 180'- 240'- 300'- 420' e 24 h dal t_0 .

Durante gli intervalli il gatto ha potuto liberamente mangiare o bere.

Preparazione dei campioni

I campioni ematologici ottenuti sono stati posti in provette eparinizzate e successivamente centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti, così da permettere la separazione del plasma.

Il plasma, separato dalla parte corpuscolata del sangue, è stato posto con l'uso di pipette usa e getta, ciascuna da usare per un singolo campione, in apposite provette, sulle quali è stata apposta un'etichetta riportante il tempo del prelievo corrispondente, conservate in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi.

I campioni plasmatici ottenuti per centrifugazione sono stati poi sottoposti a estrazione.

Sono stati posti in eppendorff pulite 50 µl di plasma e 50 µl di soluzione acquosa di iopentolo (50 µl/ml), sottoposti ad agitazione nel vortex per 60'' e successivamente estratti con 100 µl di diclorometano (CH_2Cl_2) e 150 µl di acqua distillata. La soluzione così ottenuta è stata sottoposta ad agitazione in vortex per 60'' e successivamente a centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Il supernatante è stato nuovamente sottoposto a centrifugazione e successivamente iniettato in HPLC.

Analisi farmacocinetica

I risultati ottenuti mediante analisi HPLC dei campioni precedentemente sottoposti ad estrazione sono stati elaborati al computer attraverso il software Easy Fit® per Macintosh (Istituto Mario Negri, Milano, Italia). Per ciascun soggetto del gruppo HC e CKD sono state analizzate le curve della concentrazione plasmatica di ioexolo nel tempo mediante un modello farmacocinetico non compartimentale. L'analisi farmacocinetica è stata poi ripetuta per ciascun soggetto applicando modelli ridotti di campionamento (Modello A, Modello B, Modello C, Modello D).

Il modello di riferimento è caratterizzato dall'esecuzione di campionamenti a 5'-15'-30'-45'-60'- 90'- 180'- 240'- 300'- 420'- 24 h.

Il Modello A prevede una riduzione dei campionamenti ematici e si basa su quattro prelievi di sangue a 5', 30', 1 h e 4 h; il Modello B prevede una riduzione dei campionamenti e si basa su quattro prelievi, mantenendo i campionamenti a 5', 30', 1 h e 2 h; il Modello C prevede una riduzione dei campionamenti, basata su quattro prelievi rispettivamente ai tempi 5', 1 h, 2 h e 4 h; il Modello D prevede una riduzione dei campionamenti con tre prelievi rispettivamente ai tempi 5', 30', 1 h.

Per l'analisi dei modelli ridotti di campionamento è stato adottato il modello farmacocinetico non compartimentale.

Analisi statistica

È stato calcolato per entrambi i gruppi (HC e CKD) il valore medio di GFR (ml/min-kg) ottenuto applicando il metodo di riferimento a dodici campioni e i modelli semplificati (Modello A, Modello B, Modello C, Modello D).

È stato eseguito il t-test fra i valori di GFR ottenuti per entrambi i gruppi per determinare la GFR attraverso il modello di riferimento e i quattro modelli semplificati.

Per ciascun gruppo di pazienti (HC e CKD), mediante la correlazione di Pearson ($p < 0,05$), sono stati messi a confronto i valori di GFR di riferimento con quelli ottenuti mediante l'applicazione dei modelli semplificati A, B, C e D.

Allo stesso modo è stata applicata l'analisi di Bland- Altman per confrontare i valori di GFR di riferimento con i valori ottenuti mediante i modelli semplificati, in entrambi i gruppi (HC e CKD).

RISULTATI

Analisi t- test

Il gruppo HC, composto da 39 gatti, presenta un range di creatinina plasmatica di 0,80-1,58 mg/dl, con un valore medio di 1,24 mg/dl.

I valori di GFR riscontrati mediante il metodo di riferimento variano da un minimo di 1,64 ml/min- kg fino a un massimo di 8,58 ml/min-kg, con un valore medio di 3,25 ml/min-kg \pm SE 0,27.

I valori di GFR ottenuti con il Modello A variano da un minimo di 1,52 ml/min-kg fino a un massimo di 6,80 ml/min-kg, con un valore medio di 3,32 ml/min-kg \pm SE 0,47.

I valori di GFR ottenuti mediante il Modello B rientrano in un range compreso fra 1,64 ml/min-kg e 6,62 ml/min-kg, con un valore medio di 3,28 ml/min-kg \pm SE 0,38.

I valori di GFR ottenuti mediante il Modello C rientrano in un range compreso fra 1,40 ml/min-kg e 6,87 ml/min-kg, con valore medio 3,08 ml/min-kg \pm SE 0,41.

I valori di GFR ottenuti con il Modello D variano da un minimo di 1,51 ml/min-kg a un massimo di 7,24 ml/min-kg, con un valore medio di 3,43 ml/min-kg \pm SE 0,39.

Il gruppo CKD è composto da 14 gatti con segni clinici di PU/PD e creatinina plasmatica oltre il range di riferimento (1,6 mg/dl), compresa fra 1,87 mg/dl e 3 mg/dl (valore medio= 2,54 mg/dl).

I valori di GFR riscontrati mediante il metodo di riferimento variano da un minimo di 1,45 ml/min-kg a un massimo di 3,81 ml/min-kg, con un valore medio di 2,30 ml/min-kg \pm SE 0,19.

I valori di GFR ottenuti mediante il Modello A sono compresi fra 1,25 ml/min-kg e 2,99 ml/min-kg con un valore medio di 2,11 ml/min-kg \pm SE 0,17.

I valori di GFR ottenuti con il Modello B variano da un minimo di 1,49 ml/min-kg a un massimo di 4,17 ml/min-kg, con un valore medio di 2,57 ml/min-kg \pm SE 0,23.

I valori di GFR ottenuti mediante il Modello C sono compresi fra 1,35 ml/min-kg e 3,66 ml/min-kg, con un valore medio di 2,28 ml/min-kg \pm SE 0,19.

I valori di GFR ottenuti mediante il Modello D variano da un minimo di 1,36 ml/min-kg a un massimo di 4,24 ml/min-kg con un valore medio di 2,45 ml/min-kg \pm SE 0,26.

Tabella 8: Valori medi di creatinina plasmatica (mg/dl) e di GFR (ml/min-kg) a confronto nei gruppi HC e CKD, ottenuti mediante il modello di riferimento e i quattro modelli semplificati. SE: errore standard

	Creatinina (mg/dl)	Mod. di riferimento (GFR\pmSE)	Mod.A (GFR\pmSE)	Mod. B (GFR\pmSE)	Mod. C (GFR\pmSE)	Mod. D (GFR\pmSE)
HC	1,24	3,25 \pm 0,27	3,32 \pm 0,47	3,28 \pm 0,38	3,08 \pm 0,41	3,43 \pm 0,39
CKD	2,54	2,30 \pm 0,17	2,11 \pm 0,17	2,57 \pm 0,23	2,28 \pm 0,19	2,45 \pm 0,26

Il t-test ($p < 0,05$) adottato per mettere a confronto i valori di GFR dei due gruppi di pazienti (HC e CKD), ottenuti con il metodo di riferimento, ha messo in evidenza una significativa differenza fra i due gruppi di soggetti ($p = 0,003$). Stesso risultato è stato ottenuto applicando il t-test ai valori di GFR di entrambi i gruppi (HC e CKD) ottenuti mediante i quattro modelli semplificati.

Il t-test ($p < 0,05$) utilizzato per la correlazione dei valori di GFR ottenuti mediante il Modello A nei due gruppi (HC e CKD) ha mostrato una significativa differenza fra il gruppo HC e il gruppo CKD, pari a $p = 0,0005$.

Il t-test ($p < 0,05$) utilizzato per la correlazione dei valori di GFR ottenuti mediante il Modello B nei due gruppi (HC e CKD) ha mostrato una significativa differenza fra il gruppo HC e il gruppo CKD, pari a $p = 0,01$.

Il t-test ($p < 0,05$) utilizzato per la correlazione dei valori di GFR ottenuti mediante il Modello C nei due gruppi (HC e CKD) ha mostrato una significativa differenza fra il gruppo HC e il gruppo CKD, pari a $p = 0,001$.

Il t-test ($p < 0,05$) utilizzato per la correlazione dei valori di GFR ottenuti mediante il Modello A nei due gruppi (HC e CKD) ha mostrato una significativa differenza fra il gruppo HC e il gruppo CKD, pari a $p = 0,004$.

GFR modello di riferimento

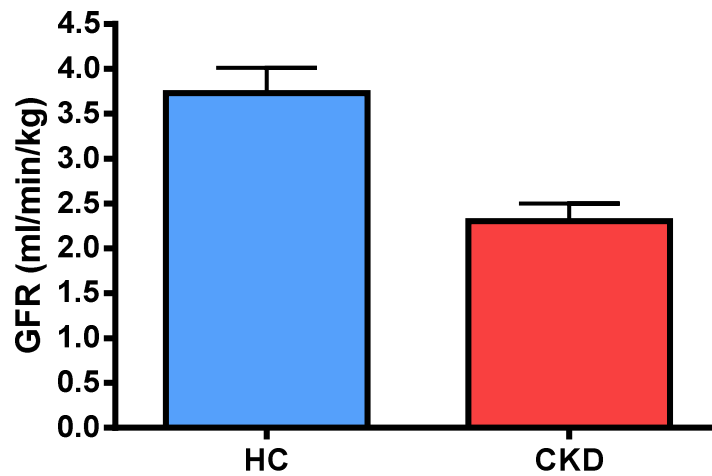


Figura 5: t-test fra la GFR del gruppo HC (blu) e del gruppo CKD (rosso) mediante il modello di riferimento. Si nota una significativa differenza ($p=0,003$) fra i due gruppi. Il valore medio di GFR nel gruppo HC risulta essere di $3,25 \pm SE 0,27$ ml/min/kg mentre nel gruppo CKD il valore medio di GFR riscontrato è $2,30 \pm SE 0,19$.

GFR Modello A

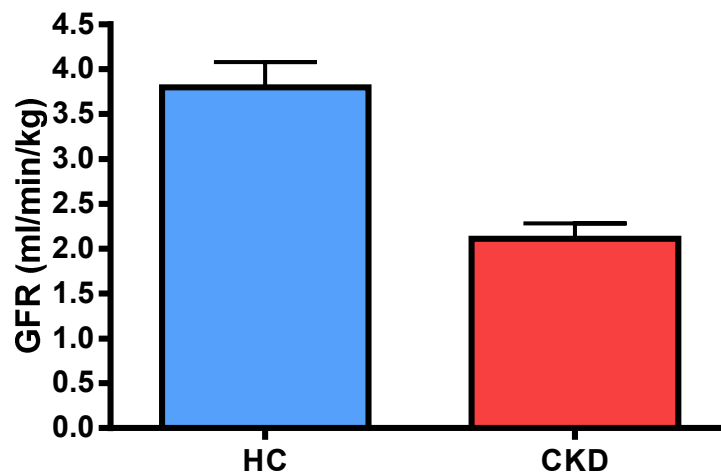


Figura 6: t-test fra la GFR del gruppo HC (blu) e del gruppo CKD (rosso) mediante il modello a campionamento ridotto A. Si nota una significativa differenza ($p=0,0005$) fra i due gruppi. Il valore medio di GFR nel gruppo HC risulta essere di $3,32 \pm SE 0,47$ ml/min/kg mentre nel gruppo CKD il valore medio di GFR riscontrato è $2,11 \pm SE 0,17$.

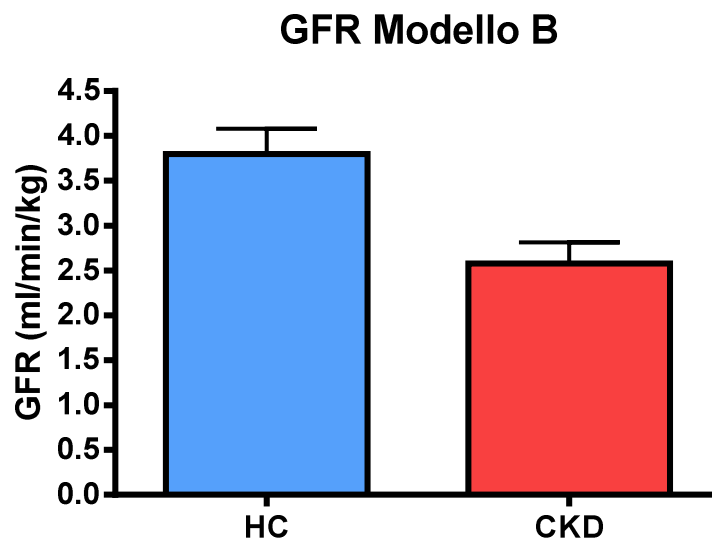


Figura 7: t-test fra la GFR del gruppo HC (blu) e del gruppo CKD (rosso) mediante il modello a campionamento ridotto B. Si nota una significativa differenza ($p=0,01$) fra i due gruppi. Il valore medio di GFR nel gruppo HC risulta essere di $3,28 \pm SE 0,38$ ml/min/kg mentre nel gruppo CKD il valore medio di GFR riscontrato è $2,57 \pm SE 0,23$.

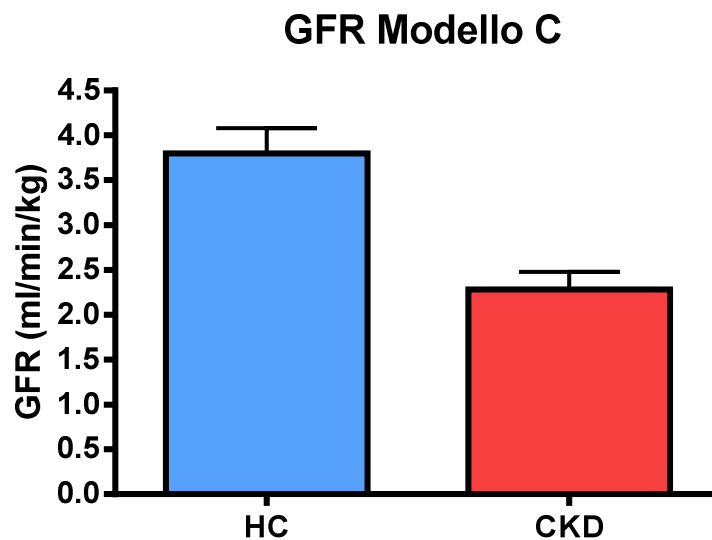


Figura 8: t-test fra la GFR del gruppo HC (blu) e del gruppo CKD (rosso) mediante il modello a campionamento ridotto C. Si nota una significativa differenza ($p=0,001$) fra i due gruppi. Il valore medio di GFR nel gruppo HC risulta essere di $3,08 \pm SE 0,41$ ml/min/kg mentre nel gruppo CKD il valore medio di GFR riscontrato è $2,28 \pm SE 0,19$.

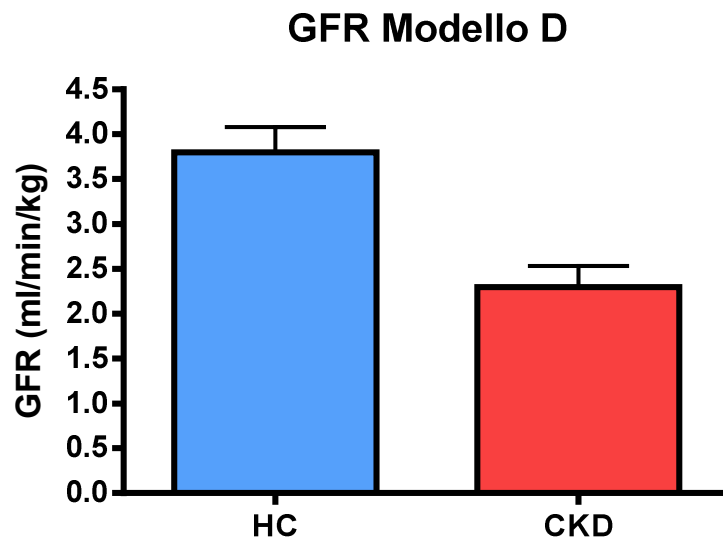


Figura 9: t-test fra la GFR del gruppo HC (blu) e del gruppo CKD (rosso) mediante il modello a campionamento ridotto D. Si nota una significativa differenza ($p=0,004$) fra i due gruppi. Il valore medio di GFR nel gruppo HC risulta essere di $3,43 \pm SE 0,39$ ml/min/kg mentre nel gruppo CKD il valore medio di GFR riscontrato è $2,45 \pm SE 0,26$.

Correlazione di Pearson e analisi di Bland-Altman nel gruppo dei gatti clinicamente sani (HC)

Modello A

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello A (5', 30', 1 h, 4 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9596 e un R^2 di 0,9207.

Tabella 9: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello A e il Modello di riferimento

<i>Numero di casi</i>	<i>39</i>
Pearson r	0,9596
Intervallo di confidenza	0,9237 to 0,9788
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R2	0,9207

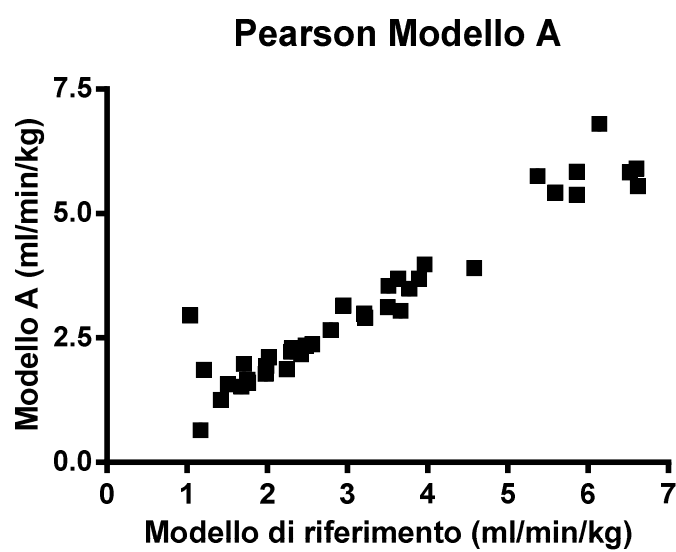


Figura 10: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello A (5'- 30'- 1 e 4 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,9207$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias= 0,10) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato A.

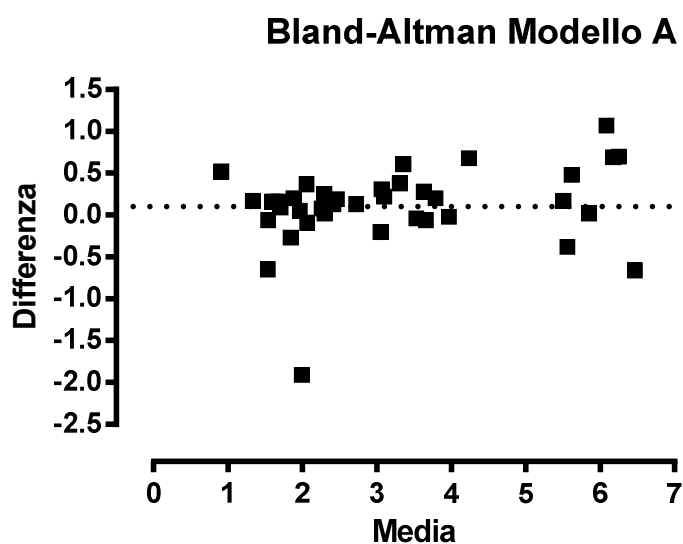


Figura 11: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello A. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= 0,10).

Modello B

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello B (5', 30', 1 e 2 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9782 e un R^2 di 0,9570.

Tabella 10: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello B e il Modello di riferimento

Numero di casi	39
Pearson r	0,9782
Intervallo di confidenza	0,9582 to 0,9887
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,9570

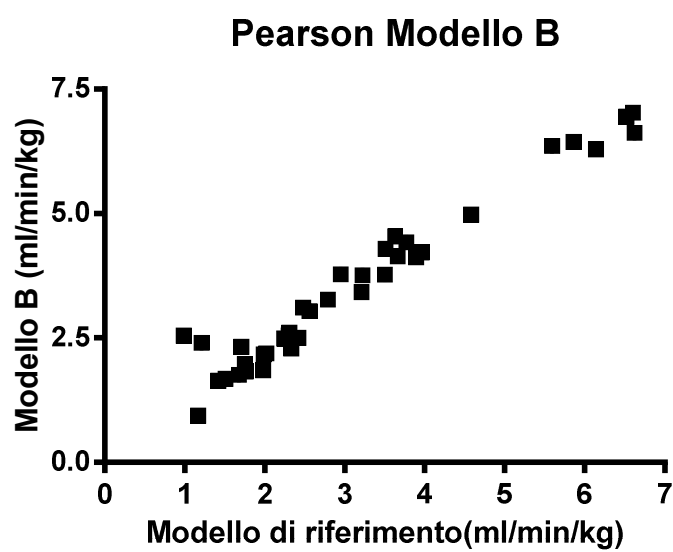


Figura 12: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B (5'- 30'- 1 e 2 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,9570$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias=- 0,39) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato B.

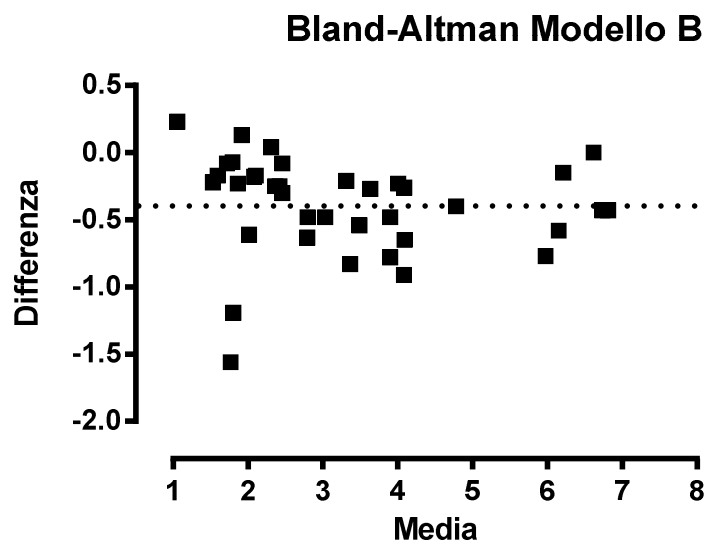


Figura 13: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= - 0,39).

Modello C

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello C (5', 1 h, 2 h, 4 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9408 e un R^2 di 0,8852.

Tabella 11: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello C e il Modello di riferimento

Numero di casi	39
Pearson r	0,9408
Intervallo di confidenza	0,8893 to 0,9688
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,8852

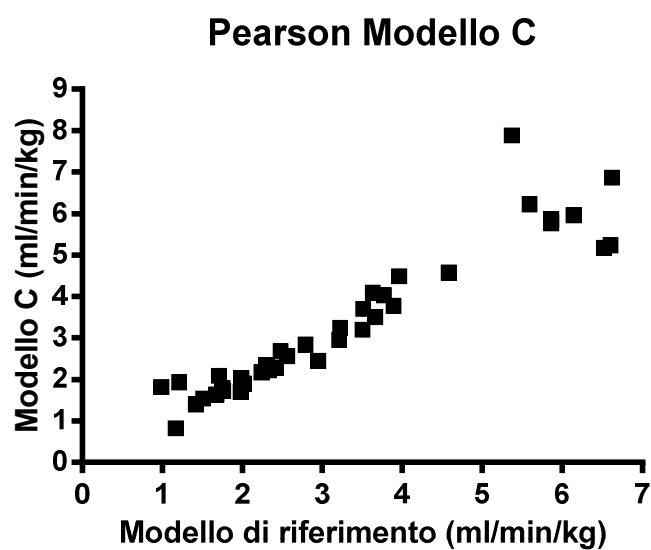


Figura 14: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello C (5'- 1- 2 e 4 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,8852$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias=- 0,04) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato C.

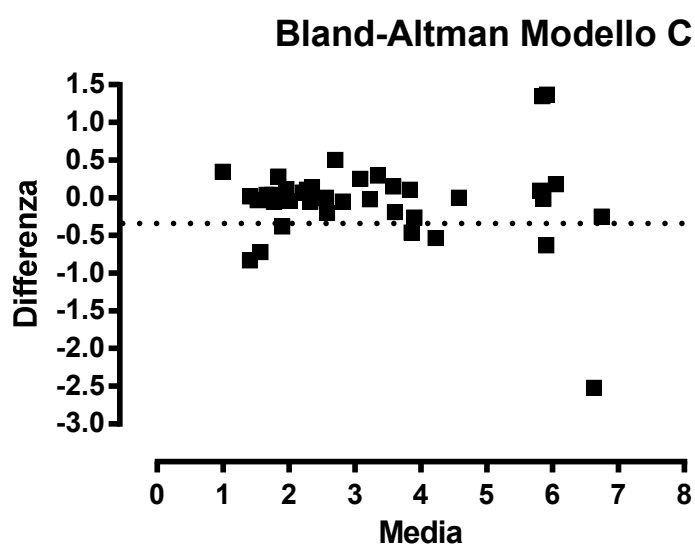


Figura 15: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= - 0,04).

Modello D

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello D (5', 30', 1 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9165 e un R^2 di 0,8399.

Tabella 12: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello D e il Modello di riferimento

<i>Numero di casi</i>	39
Pearson r	0,9165
Intervallo di confidenza	0,8454 to 0,9557
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,8399

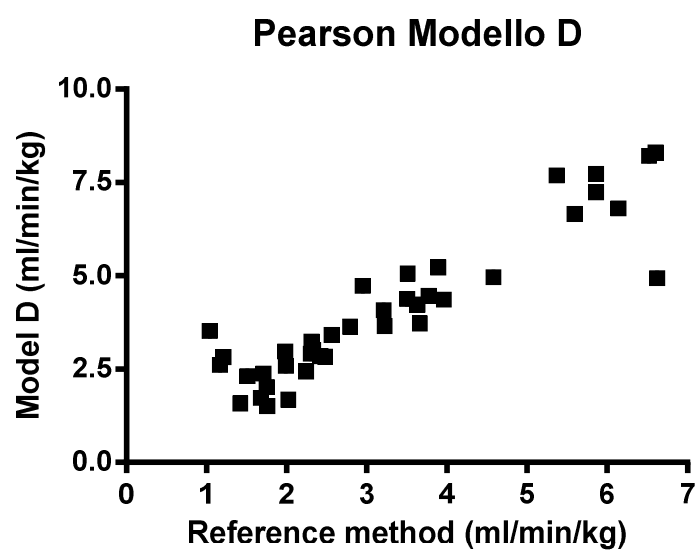


Figura 16: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello C (5'- 1- 2 e 4 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,8852$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias=- 0,80) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato D.

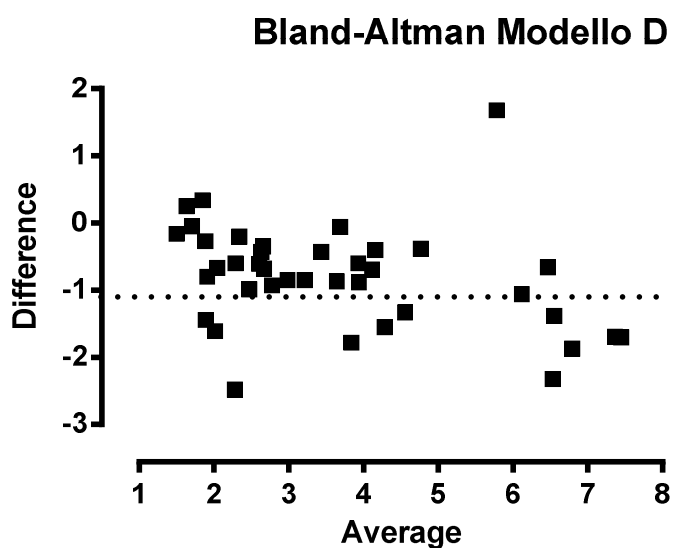


Figura 17: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= - 0,80).

Correlazione di Pearson e analisi di Bland-Altman nel gruppo dei gatti in Insufficienza renale cronica (CKD)

Modello A

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello A (5', 30', 1 e 4 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9521 e un R^2 di 0,9065.

Tabella 13: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello A e il Modello di riferimento

<i>Numero di casi</i>	<i>14</i>
Pearson r	0,9521
Intervallo di confidenza	0,8436 to 0,9859
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,9065

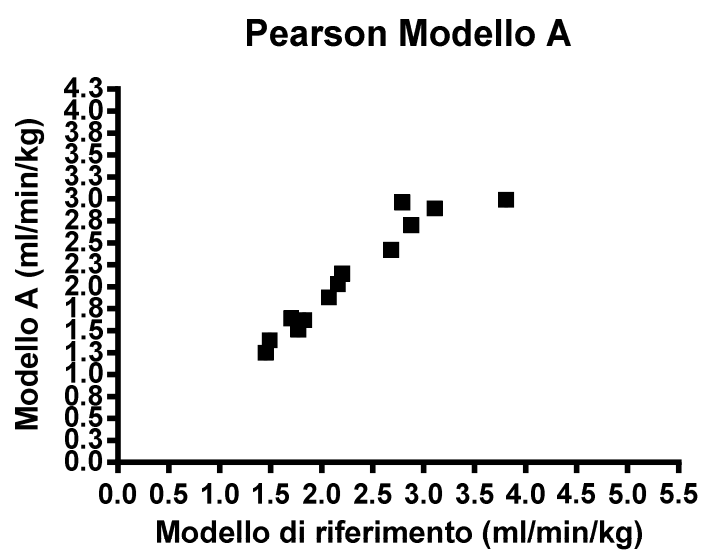


Figura 18: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello A (5'- 30'-1 e 4 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,9065$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias= 0,20) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato A.

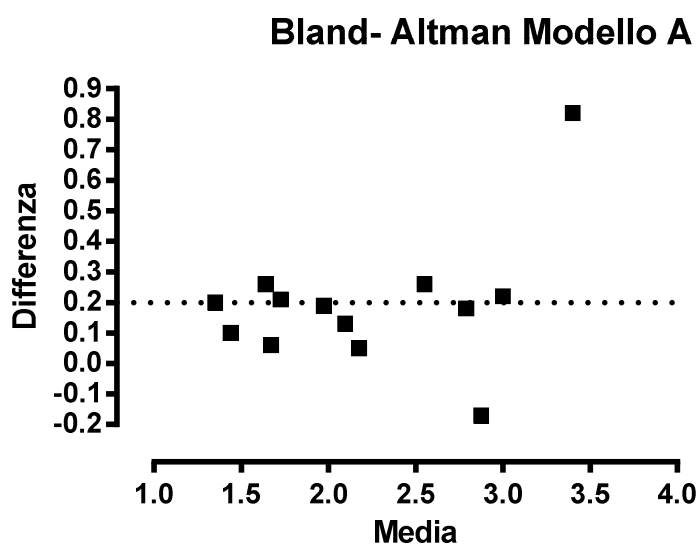


Figura 19: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello A. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= 0,20).

Modello B

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello B (5', 30', 1 e 2 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9886 e un R^2 di 0,9774.

Tabella 14: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello B e il Modello di riferimento a sette campionamenti

Numero di casi	14
Pearson r	0,9886
Intervallo di confidenza	0,9613 to 0,9967
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,9774

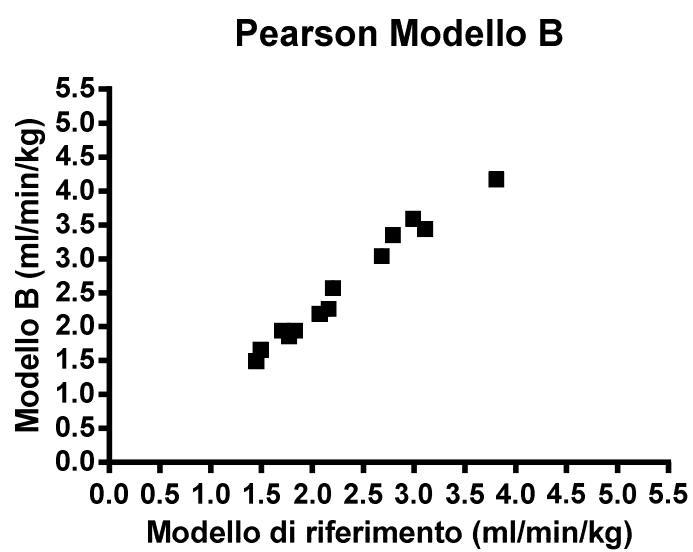


Figura 20: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B (5'- 30'-1 e 2 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,9774$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias=- 0,31) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato B.

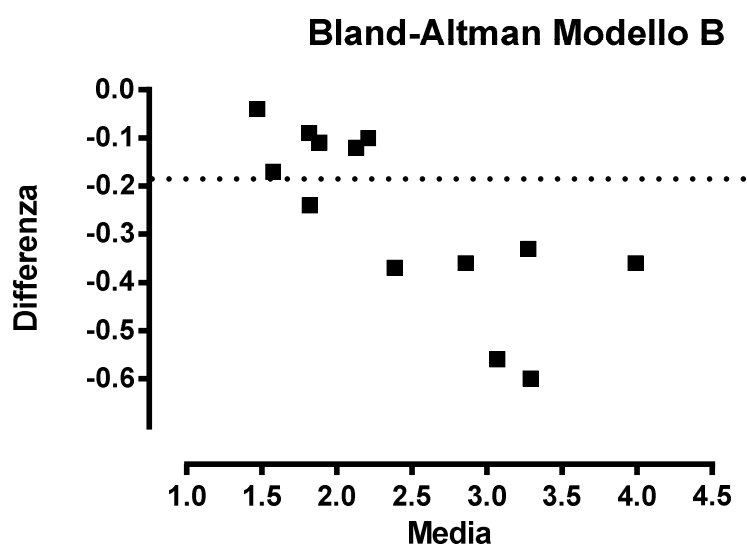


Figura 21: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello B. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= - 0,31).

Modello C

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello C (5', 1, 2 e 4 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9869 e un R^2 di 0,9740.

Tabella 15: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello C e il Modello di riferimento

<i>Numero di casi</i>	<i>14</i>
Pearson r	0,9869
Intervallo di confidenza	0,9555 to 0,9962
P-value (two-tailed)	$P < 0,0001$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,9740

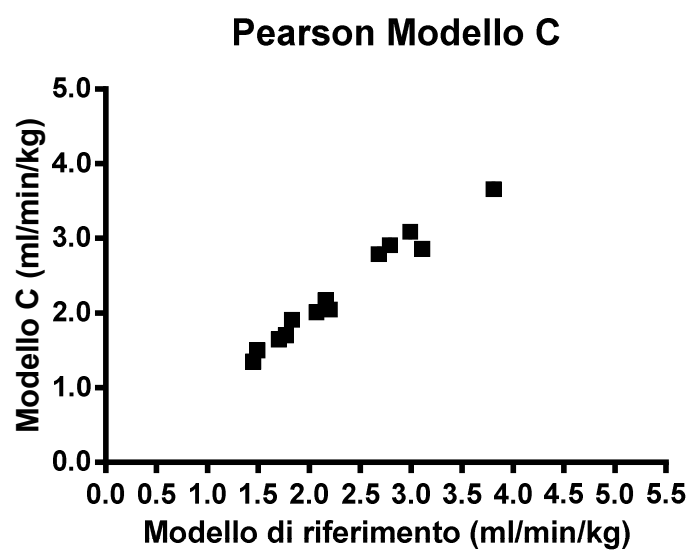


Figura 22: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello C (5'- 1- 2 e 4 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0001$) caratterizzata da un $R^2 = 0,9740$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias= 0,05) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato C.

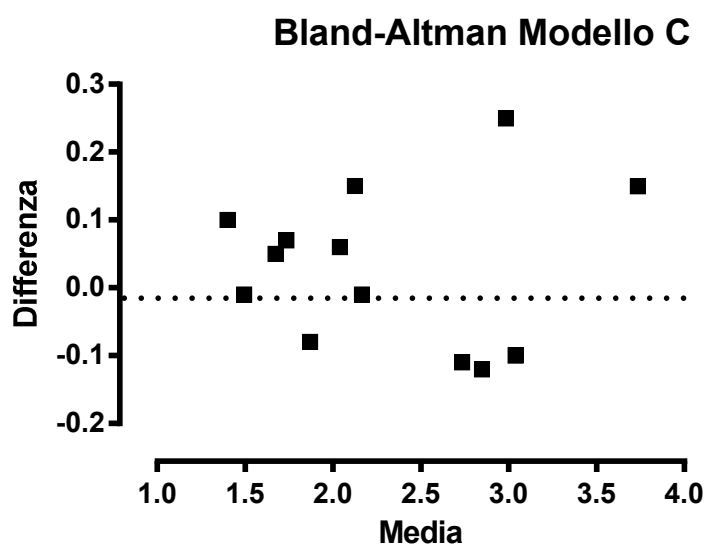


Figura 23: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello C. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= 0,05).

Modello D

Lo studio di correlazione mediante il test di Pearson ($p < 0,05$) fra i valori della GFR ottenuti tramite il modello di riferimento e i valori che sono stati determinati mediante il modello D (5', 30', 1 h) mostra una correlazione lineare positiva ($p < 0,0032$), caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,7724 e un R^2 di 0,5966.

Tabella 16: Risultati dello studio di correlazione tra il Modello C e il Modello di riferimento

<i>Numero di casi</i>	<i>14</i>
Pearson r	0,7724
Intervallo di confidenza	0,3564 to 0,9328
P-value (two-tailed)	$P < 0,0032$
Correlazione significativa	Alpha= 0,05
R^2	0,5966

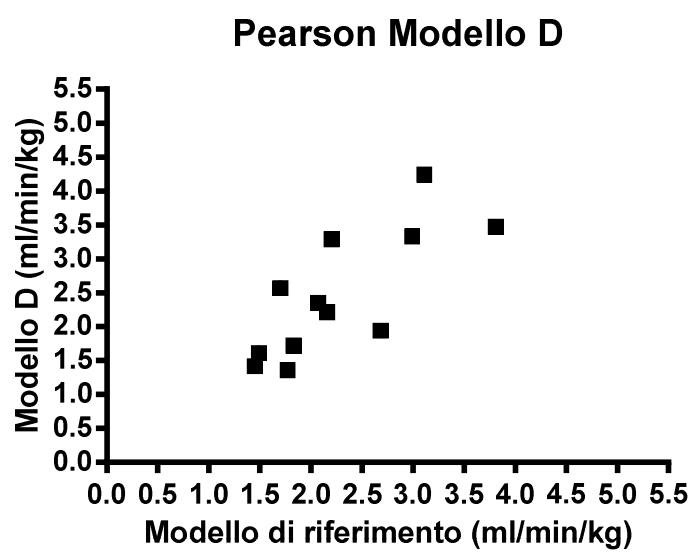


Figura 24: Test di correlazione di Pearson fra i valori medi di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello D (5'- 30'- 1 h). Correlazione lineare positiva ($p < 0,0032$) caratterizzata da un $R^2 = 0,5966$

Allo stesso modo, l'analisi di Bland-Altman ha riportato l'assenza di una differenza significativa (bias= - 0,18) fra i valori medi ottenuti mediante il modello di riferimento e i valori medi ottenuti con il Modello a campionamento semplificato D.

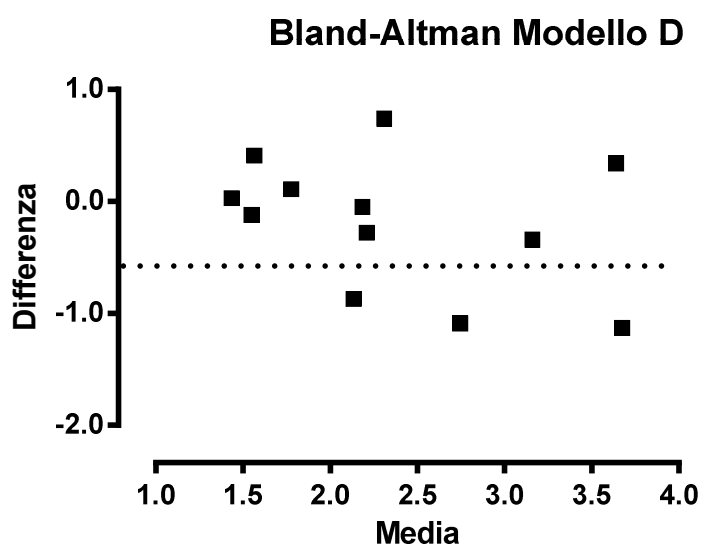


Figura 25: Analisi di Bland-Altman: differenze dalla media fra i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento e il Modello D. La differenza dalla media non è risultata clinicamente significativa (bias= - 0,18).

DISCUSSIONE

L'insufficienza renale cronica (CKD) è una patologia caratterizzata da una progressiva, lenta e irreversibile perdita di funzionalità renale che colpisce molto frequentemente il cane e il gatto (0,5-7% nel cane e 1,6-20% nel gatto⁷), con un importante incremento di incidenza nell'età avanzata: la prevalenza di CKD può raggiungere infatti in età avanzata il 10% nella popolazione canina e ben il 35% nella popolazione felina²⁶.

L'importanza di una diagnosi precoce di CKD è stata largamente discussa e dimostrata in studi scientifici svolti sia in medicina umana che veterinaria.

La GFR rappresenta il "*gold standard test*" per la diagnosi di CKD: la sua importanza risiede nella capacità di rilevare la presenza di una perdita di funzionalità renale in stadi molto precoci della patologia¹⁴. La GFR è infatti l'unico test diagnostico in grado di svelare la presenza della patologia quando questa si trova allo stadio IRIS 1, stadio subclinico caratterizzato nella maggior parte dei casi da una assenza di sintomi e da livelli di creatinina entro i range fisiologici²⁶.

Nonostante sia riconosciuta universalmente la sua importanza nella diagnosi precoce di disfunzione renale, la GFR non trova frequentemente applicazione nella pratica clinica veterinaria data la sua complessità di esecuzione (tecniche adottate, numero di campioni necessari, disponibilità dei marker renali utilizzati)¹³.

Le metodiche di valutazione della GFR che si basano sulla misurazione della clearance urinaria risultano poco praticabili nella routine diagnostica ambulatoriale poiché necessitano dell'introduzione di un

catetere urinario, possibile fonte di infezioni delle vie urinarie, e di una raccolta accurata e prolungata nel tempo delle urine prodotte, che comporta una ridotta collaborazione da parte del paziente e una scarsa praticità per il proprietario²⁸⁻³¹.

La determinazione della GFR mediante metodo scintigrafico offre il vantaggio di poter valutare la funzionalità glomerulare globale o individuale di ogni rene, senza richiedere il prelievo di campioni ematici o urinari; di contro però, poiché la tecnica si basa sull'utilizzo di composti radioattivi, sono necessari una specifica strumentazione e l'isolamento dell'animale nelle 24 ore che seguono l'iniezione dell'analita⁶².

Le metodiche di determinazione della GFR che utilizzano la misurazione della clearance plasmatica di un analita sembrano essere le più applicabili nella realtà clinica veterinaria poiché, nonostante anch'esse portino con sé degli svantaggi quali l'elevato numero di campioni richiesto e la possibilità di errori analitici, risultano essere di più facile esecuzione rispetto alle tecniche sopra riportate.

Lo ioexolo è un mezzo di contrasto iodinato che rappresenta un'ottima alternativa all'utilizzo di inulina o sostanze radioattive in numerose specie (uomo, cavallo, maiale, cane, gatto). È una sostanza priva di rischi radioattivi, il cui utilizzo non richiede specifiche misure di protezione, è facilmente reperibile in commercio ed ha un costo basso, non ha effetti collaterali dimostrati sul cane e sul gatto³⁰.

Nei piccoli animali, in particolare nel cane, sono molti gli studi effettuati per ricercare un metodo semplificato di determinazione della GFR che dia una buona accuratezza dei risultati e che nel contempo renda la tecnica di più facile esecuzione e maggiormente tollerabile dall'animale: ad oggi nel cane il metodo di determinazione

della GFR mediante clearance dello ioexolo a due campionamenti in 2 ore risulta essere il miglior compromesso fra accuratezza e facile applicabilità del metodo²⁹.

L'utilizzo di un metodo semplificato a campionamento ridotto riveste un'importanza ancora maggiore nel gatto, la cui tollerabilità verso qualsiasi tipo di manualità è molto scarsa, rendendo necessario lo sviluppo di un metodo per la determinazione della GFR che richieda il minor numero di campionamenti nel minor tempo possibile.

Questo studio si basa sulla ricerca di un metodo semplificato, sufficientemente accurato e di facile esecuzione per la determinazione della GFR nel gatto, valutata mediante la clearance plasmatica dello ioexolo inoculato in unico bolo IV.

I pazienti sono stati divisi in due gruppi: HC, gatti clinicamente sani; CKD, gatti in Insufficienza renale.

La determinazione della concentrazione dello ioexolo nel sangue è stata eseguita mediante un sistema HPLC, che richiede piccole quantità di plasma (50 µl) per poter offrire dei risultati attendibili: questo rappresenta un notevole vantaggio in particolare nel caso di pazienti anemici o con forte disidratazione per i quali si rende difficile prelevare grandi quantità di sangue. Inoltre grazie all'elevata stabilità dello ioexolo, il clinico che esegue i campionamenti può avvalersi dell'invio dei campioni a laboratori specializzati localizzati anche a distanza, previa congelamento e spedizione degli stessi²⁰.

Al dosaggio adottato in tale studio (64,7 mg/kg) , lo ioexolo non presenta alcun pericolo per l'animale e può esser utilizzato anche in soggetti nefropatici³⁰: nessuno dei gatti a cui è stato inoculato ioexolo nel corso di questo studio ha presentato effetti collaterali immediati o tardivi.

Il valore della GFR ottenuto è stato espresso in ml/min/kg: non si è resa necessaria la standardizzazione tramite la superficie corporea (ml/min/m²) poiché nel gatto, diversamente da quanto riportato per il cane, non si hanno notevoli differenze fra i risultati ottenuti mediante i due metodi di standardizzazione³.

Per la determinazione del valore della GFR ottenuto è stato utilizzato il modello farmacocinetico non-compartimentale che dà una stima della GFR sufficientemente accurata, senza necessitare di specifici modelli matematici.

Il modello a dodici prelievi (0'-5'-15'-30'-45'-60'- 90'- 180'- 240'- 300'- 420'- 24 h) adottato come metodo di riferimento per rilevare la concentrazione plasmatica dello ioexolo in tale studio dà una stima molto accurata della GFR, ma la sua laboriosità, il numero elevato di campioni necessari e il costo eccessivo fanno sì che non sia facilmente utilizzabile nella pratica clinica, rappresentando inoltre una fonte di forte stress per i pazienti di specie felina.

I modelli (A, B, C, D) presi in esame offrono una semplificazione, in termini di tempo e di numero di campionamenti rispetto al modello di riferimento, garantendo comunque una buona accuratezza dei risultati di GFR ottenuti, sia nei soggetti azotemici che in quelli non azotemici.

Per ciascuno di tali modelli è stata valutata la correlazione esistente con i valori di GFR ottenuti mediante il modello di riferimento.

La correlazione di Pearson ($p < 0,05$) ha mostrato una correlazione lineare positiva per tutti i protocolli adottati, con coefficiente di Pearson e R^2 molto elevati, in entrambi i gruppi (HC e CKD).

Allo stesso modo l'analisi di Bland-Altman ha rilevato una differenza rispetto alla media molto bassa che mostra una differenza

statisticamente irrilevante fra i risultati ottenuti mediante il modello di riferimento e i modelli semplificati.

Fra i modelli semplificati testati, il Modello D rappresenta la miglior soluzione, combinando una buona accuratezza dei risultati (HC: $R^2 = 0,5966/p < 0,0032$; CKD: $R^2 = 0,8399/p < 0,0001$) con un'ottima semplicità di esecuzione in termini di tempo e numero dei campioni. Pur non essendo risultato il metodo migliore per la determinazione della GFR in termini di accuratezza, può esser considerato un buon compromesso fra precisione del test e compliance del proprietario e dell'animale.

In conclusione, nel presente studio è stata dimostrata la validità di un modello a 3 prelievi (5'-30'-1 h) di facile esecuzione, accurato e sicuro, per la determinazione della GFR mediante clearance dello ioexolo nel gatto, che rappresenta una valida alternativa nella pratica clinica ai più comuni metodi di determinazione della GFR mediante clearance plasmatica di una sostanza e che può facilitare il clinico nella diagnosi precoce di CKD, garantendo una buona accuratezza del test unitamente a una notevole semplicità di esecuzione.

RINGRAZIAMENTI

Sono nata con una vocazione...fare il veterinario!

Sono cresciuta per i primi anni di vita inconsapevole di questo, ma con un amore per gli animali che si è fatto vivo fin dai primi mesi di vita: le prime parole che ho detto non sono state “mamma” o “babbo”, ma “mao mao” e “bau bau”, dal passeggiare riuscivo a scorgere gatti laddove nessuno riusciva a vederli, quando mi portavano alla fattoria mi bastava accucciarmi per avere intorno a me in pochissimi secondi tutti i gatti presenti nel cortile, “come San Francesco” mi diceva sempre la mamma.

All’età di 5 anni una mattina prima di andare all’asilo ho annunciato quello che volevo fare da grande...”Mamma e babbo, da grande voglio fare il dottore degli animali!”...ovviamente nessuno mi prendeva sul serio, i bambini cambiano idea continuamente...e invece il mio sogno è rimasto vivido per anni finché dopo il liceo ho deciso che l’unico lavoro che mi avrebbe reso felice nella vita sarebbe stato quello.

Ricorderò sempre il giorno del test di ammissione: tanta ansia poiché da quell’esame sarebbe dipeso il raggiungimento del mio sogno; ricorderò per sempre il giorno in cui tornando a casa ho trovato tutta la mia famiglia riunita a festeggiarmi poiché ce l’avevo fatta; ricorderò sempre la mia felicità quando, aperto il libretto universitario, ho letto “Iscritta al Corso di studi in Medicina Veterinaria”.

E nel lontano inverno 2003 è iniziato il mio percorso...non è stato tutto rose e fiori, ci sono stati momenti in cui avrei voluto cedere, momenti in cui non riuscivo a vedere la fine, altri momenti in cui quella passione che mi ha sempre accompagnato è venuta meno ma nonostante tutto non ho mollato, sono andata avanti e piano piano ho visto sempre più vicino quel traguardo tanto atteso fino ad arrivare ad oggi...il Grande Giorno!

Mamma e babbo, grazie per aver capito l’importanza che questa laurea ha sempre avuto per me, grazie per non aver mai mollato insieme a me, grazie per i mille sacrifici fatti pur di farmi raggiungere il mio sogno.

Mimma, grazie per aver camminato con me in questa strada così difficile da percorrere...chi meglio di te può capirmi?... grazie per avermi sostenuto e per aver sempre creduto in me, grazie per le mille risate che abbiamo fatto e per i bellissimi pazzi ricordi che mi porterò dietro di questa esperienza universitaria.

Ale, grazie per le lunghissime chiacchierate al Bombardier, grazie per l'ascolto che non mi hai mai negato, grazie per la tua capacità di aver tirato fuori, con le semplici parole, ogni volta quella passione sopita dentro di me.

Musino mio, grazie per esser entrato nella mia vita e avermi reso felice... grazie a te sono riuscita a vivere serenamente questi ultimi anni di studio e grazie ai nostri progetti di vita sono riuscita a focalizzare l'obiettivo e a vedere il traguardo sempre più vicino.

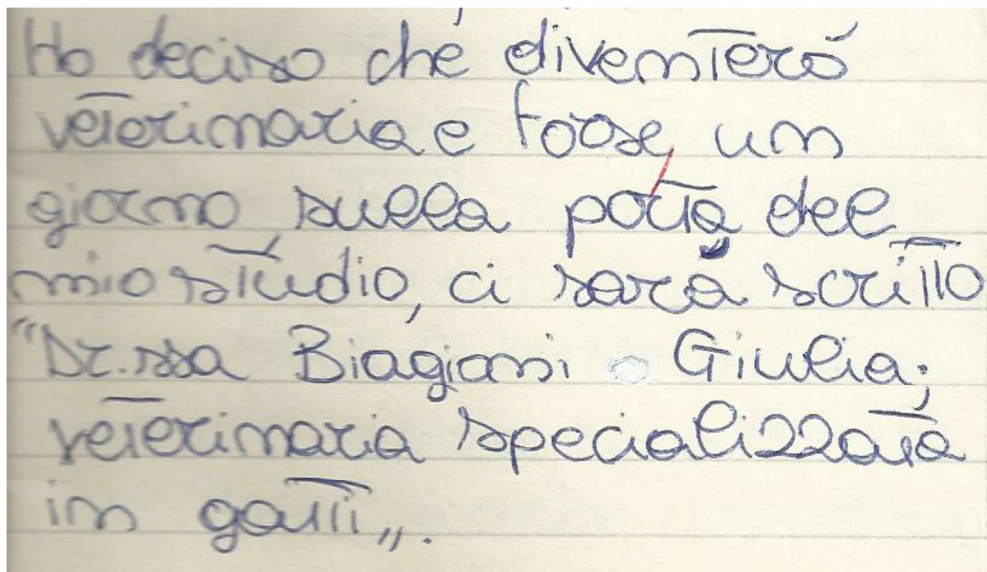
Al mio cucciolo umano, *Leonardo*, va un ringraziamento speciale...grazie, piccolino, per avermi accompagnato in questi ultimi 9 mesi senza mai mollare con me, grazie per aver reso la fine di questo percorso unica, grazie per aver infuso in me una tranquillità che mi ha permesso di vivere questo ultimo periodo pieno di ansie ed emozioni nel modo migliore possibile.

Grazie alla *Prof.ssa Guidi*, senza la quale non sarebbe stato possibile il raggiungimento di questo traguardo: la ringrazio in particolare per avermi trasmesso la sua passione per il nostro lavoro e per avermi insegnato l'umiltà, elemento fondamentale per la nostra professione... se penso a me e al mio futuro professionale, mi rivedo molto in Lei! Grazie alla *Dott.ssa Ilaria Lippi* per la disponibilità che l'ha sempre contraddistinta e per il grande e tempestivo aiuto che mi ha dato per la stesura di questa tesi.

Grazie alla *Dott.ssa Antonella Notaro*, per il supporto psicologico che mi ha dato : grazie per avermi aiutato a ritrovare quella autostima persa durante il percorso.

Grazie a *Daniele* che, pur facendo parte della mia vita per un periodo di tempo limitato, mi è stato vicino proprio nei momenti più bui del mio percorso di studi: grazie per avermi spronato sempre e per aver creduto in me più di quanto io stessa riuscissi a fare.

Ma la persona che più di tutti vorrei ringraziare è Me stessa...per la determinazione che fa parte di me, per la passione che ho sempre ritrovato, per la forza che ho messo in tutto quello che ho fatto...ringrazio me stessa per non aver mollato, per essermi rialzata sempre dopo esser caduta, per aver creduto con tutta me stessa nel mio sogno...

A photograph of a handwritten note on lined paper. The text is written in blue ink and reads: "Ho deciso che diventerò veterinaria e forse un giorno sulla porta del mio studio, ci sarà scritto 'Dr.ssa Biagioni o Giulia, veterinaria specializzata in gatti'." The word "veterinaria" is underlined in the original image. There is a small red mark above the word "forse".

Ho deciso che diventerò
veterinaria e forse un
giorno sulla porta del
mio studio, ci sarà scritto
"Dr.ssa Biagioni o Giulia,
veterinaria specializzata
in gatti".

Adesso posso dire davvero: "Ce l'ho fatta!!!".

Giulia

BIBLIOGRAFIA

1. Sherwood L, Klandorf H, Yancey P, 2010, *Sistema escretore*. In: "Fisiologia degli animali: dai geni agli organismi", Zanichelli, Bologna, Italia
2. M.G. Clement, 2002, *Il rene*. In: "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia", G. Aguggini, V. Beghelli, M.G. Clement, A. D'Angelo, A. Debenedetti, C. Facello, L.F. Giulio, R. Guglielmino, A. Lucaroni, G. Maffeo, A. Morongiu, S. Naitana, P. Nuvoli, R. Piazza, pag..., UTET, Torino, Italia
3. Claudio Sighieri, 1996, "Nozioni di fisiologia con riferimenti a specie animali di interesse veterinario", Servizio editoriale universitario di Pisa, Pisa, Italia
4. Von Hendy- Willson VE, Pressler BM, 2010, An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats, *The Veterinary Journal*, 188, 156-165
5. M. G. Clement, 2009, *Fisiologia dell'apparato escretore*. In: "Fisiologia veterinaria", L. Avallone, G. Caola, M. G. Clement, A. Ferlazzo, S. Naitana, M. Panzera, M. Albertini, E. Fazio, G. Piccione, Point veterinaire Italie, Milano, Italia
6. Finco DR, 1999, *Fisiologia renale applicata*. In: "Nefrologia e urologia del cane e del gatto", 29-46, C. A. Osborne e D. R. Finco, UTET, Torino, Italia
7. C. Facello, R. Guglielmino, 1998, *Il sangue*. In: "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia", pag. 339, UTET, Torino, Italia
8. Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H, 2010, *The assessments of factors that affect glomerular filtration rate and indirect markers*

of renal function in dogs and cats, The Journal of Veterinary Medical Science, 72, 1129-1136

9. A. Debenedetti, 1998, *Funzione endocrina del rene*. In: "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia", pag. 707-708, UTET, Torino, Italia
10. G. Guidi, 2006, *Alterazioni dell'apparato urinario*. In: "Ailuropatie, dal sintomo alla terapia", pag. 147-158, SEE, Firenze, Italia
11. Polzin DJ, Osborne CA, 1999, *Patologie del rene- Fisiopatologia dell'insufficienza renale e dell'uremia*. In: "Nefrologia e urologia del cane e del gatto", pag. 341-373, C.A. Osborne, D.R. Finco, UTET, Torino, Italia
12. J.P. Braun and H.P. Lefebvre, 2005, "*Early detection of Renal disease in the canine patient*", *European Journal of Companion Animal Practice*, 15, 59-65
13. Michael Schaer, 2006, *Patologie dell'apparato urinario*. In: "Medicina clinica del cane e del gatto", pag. 415-420, Masson, Milano, Italia
14. Schwart GJ, Furth SL, 2007, "*Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease*", *Pediatric Nephrology* 22, 1839-1848
15. Heiene R and Moe L, 1998, "*Pharmacokinetic aspect of measurement of glomerular filtration rate in the dog*", *Journal Veterinay Internal Medicine*, 12, 401-414
16. Hoang K, Tan JC, Derby G et al., 2003, "*Determinants of glomerular hypofiltration in aging human*", *Kidney International*, 64, 1417-1424

17. Queau Y, Biourge V, Germain C, Braun JP, Watson AD, Jeunesse E, Lefebvre HP, 2007, *"Effect of aging on plasma exogenous creatinine clearance in dogs [abstract]"*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, 598
18. Van Hoek I, Vandermeulen E, Duchateau L, Lefebvre HP, Croubels S, Peremans K, Polis I, Daminet S, 2007, *"Comparison and reproducibility of plasma clearance of exogenous creatinine, exo-iohexol, endo-iohexol and 51 Cr-EDTA in young adult and aged healthy cats"*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 21, 950-958
19. Bexfield NH, Heiene R, Gerritsen RJ, Risoen U, Eliassen KA, Herrtage ME, Michell AR, 2008, *"Glomerular filtration rate estimated by 3-sample plasma clearance of iohexol in 118 healthy dogs"*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 22, 66-73
20. Heiene R, Reynolds BS, Bexfield NH, Larsen S, Gerritsen RJ, 2009, *"Estimation of glomerular filtration rate via 2- and 4-sample plasma clearance of iohexol and creatinine in clinically normal cats"*, American Journal of Veterinary Research, 70, 176-185
21. Ulla B. Berg, 2006, *"Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors"*, Nephrology Dialysis Transplantation, 21, 2577-2582
22. Fleck C, 1999, *"Determination of the glomerular filtration Rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances"*, Physiology Research, 48, 267-279

23. Hall JE, Guyton AC, Farr BM, 1977, "*A single-injection method for measuring glomerular filtration rate*", American Journal of Physiology, 232:F72-F76
24. Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H, 2009, "*Evaluation of a single sampling method for estimation of plasma iohexol clearance in dogs and cats with various kidney functions*", Journal of Veterinary Medical Science, 72, 271-278
25. Goy- Thollot I, Chafotte C, Besse S, Garnier F, Barthez P, 2006, "*Iohexol plasma clearance in healthy dogs and cats*", Veterinary Radiology & Ultrasound, 47, 168-173
26. Watson ADJ, Lefebvre HP, Concordet D, Laroute V, Ferrè JP, Braun JP, Conchou F, Toutain PL, 2002, "*Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy*", Journal of Veterinary Internal Medicine 16, 22-33
27. Braun JP, Lefebvre HP, Watson ADJ, 2003, "*Creatinine in the dog: a Review*", Veterinary Clinical Pathology 32, 162-179
28. O'Connell JMB, Romeo JA, Mudge GH, 1962, "*Renal tubular secretion of creatinine in the dog*", American Journal of Physiology 203, 985-990
29. Jacobs RM, Lumsden JH, Taylor JA, Grift E, 1991, "*Effects of Interferents on the kinetic Jaffé reaction and an enzymatic colorimetric test for serum creatinine concentration determination in cats, cows, dogs and horses*", Canadian Journal of Veterinary Research 55, 150-154
30. Finco DR, 1999, *Valutazione della funzionalità renale*. In: "*Nefrologia e urologia del cane e del gatto*", UTET, Torino, Italia

31. Blijenberg BG, Brouwer HJ, Kuller TJ, Leeneman R, Leeuwen CJM, 1994, "*Improvements in creatinine methodology: a critical assessment*", European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 32, 529-537
32. Blijenberg BG, Brouwer RJ, Baadenhuiksen H, Boerma GJM, 1995, "*Creatinine and surveys: an assessment*", European Journal of Clinical Biochemistry, 33, 855-858
33. Finco DR, Barsanti JA., 1982, "*Mechanism of urinary excretion of creatinine by the cat*", American Journal of Veterinary Research, 43, 2207–2209.
34. Deguchi E and Akuzawa M, 1997, "*Renal clearance of endogenous creatinine, urea, sodium and potassium in normal cats and cats with chronic renal failure*", The Journal of Veterinary Medical Science, 59, 509-512
35. Miyamoto K, 2001, "*Evaluation of plasma clearance of inulin in clinically normal and partially nephrectomized cats*", American Journal of Veterinary Research, 62, 1332-1335
36. Rogers KS, Komkov A, Brown SA, Lees GE, Hightower D, Russo EA, 1991, "*Comparison of four methods of estimating glomerular filtration rate in cats*", American Journal of Veterinary Research, 52, 961-964
37. Tabaru H, Finco DR, Brown SA, Cooper T, 1993, "*Influence of hydration state on renal functions of dogs*", American Journal of Veterinary Research, 54, 1758-1764
38. Haller M, Rohner K, Muller W, Reutter F, Binder H, Estelberger W, Arnold P, 2003, "*Single-injection inulin clearance for routine measurement of glomerular filtration rate in cats*", Journal of Feline Medicine & Surgery, 5, 175-181

39. Estelberger W, Petek W, Zitta S, Mauric A, Horn S, Holzer H, Poggitsch H, 1995, "*Determination of the glomerular filtration rate by identification of sinistrin kinetics*", European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry 33, 201-209
40. Brown SA, Haberman C, Finco DR, 1996, "*Use of plasma clearance of inulin for estimating glomerular filtration rate in cats*", American Journal of Veterinary Research, 57, 1702-1705
41. Gref M, Karp K, 2007, "*GFR determination in adults with a single-sample iohexol plasma clearance method based on the mean sojourn time*", Nephrology Dialysis Transplantation, 22, 3166-3173
42. Miyamoto K, 2001, "*Use of plasma clearance of iohexol for estimating glomerular filtration rate in cats*", American Journal of Veterinary Research, 62, 572-575
43. Frennby B, Sterner G, Almen T, Chai CM, Jönsson BA, Månsson S, 1996, "*Extrarenal plasma clearance of iohexol, chromium 51-ethylenediaminetetraacetic acid, and inulin in anephric pigs*", Academic Radiology, 3, 145-153
44. Gonda KC, Wilcke JR, Crisman MV, Ward DL, Robertson JL, Finco DR, Braselton WE, 2003, "*Evaluation of iohexol clearance used to estimate glomerular filtration rate in clinically normal foals*", American Journal of Veterinary Research, 64, 1486-1490
45. Nesje M, Flåøyen A, Moe L, 1997, "*Estimation of glomerular filtration rate in normal sheep by the disappearance of iohexol from serum*", Veterinary Research Communications, 21, 2129-2135
46. Katayama H, Yamaguchi K, Takashima T, et al., 1990, "*Adverse reactions to ionic and nonionic contrast media: a report from*

the Japanese committee on the safety of contrast media”,
Radiology, 175,621–628.

47. Goy- Thollot I, Besse S, Garnier F, Marignan M, Barthez PY, 2006, *“Simplified methods for estimation of plasma clearance of iohexol in dogs and cats”,* 20, 52-56
48. Miyamoto K, 2001, *“Clinical application of plasma clearance of iohexol on feline patients”,* Journal of Feline Medicine and Surgery, 3, 143-147
49. Brøchner-Mortensen J, 1972, *“A simple method for the determination of glomerular filtration rate”,* Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 30, 271–274
50. Schwartz GJ, Furth S, Cole SR, et al, 2006, *“Glomerular filtration rate via plasma iohexol disappearance: Pilot study for chronic kidney disease in children”,* Kidney International, 69, 2070–2077
51. Rehling M, Rabol A, 1989, *“Measurement of glomerular filtration rate in adults: Accuracy of five single-sample plasma clearance methods”,* Clinical Physiology, 9, 171–182.
52. Brown SA, Finco DR, Boudinot FD, et al, 1996, *“Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs”,* American Journal of Veterinary Research, 57, 105–110.
53. Krawiec DR, Badertscher RR, Twardock AR, 1986, *“Evaluation of technetium 99m-diethylenetriaminepentaacetic-acid nuclear imaging for quantitative determination of the glomerular filtration rate of dogs”,* American Journal of Veterinary Research, 47, 2175-2179
54. Cohen ML, 1974, *“Radionuclide clearance techniques”,* Seminars in Nuclear Medicine, 4, 23-38

55. Dubovsky EV and Russell CD, 1982, "*Quantitation of renal function of glomerular and tubular agents*", Seminars in Nuclear Medicine, 12, 308-329
56. Chervu LR and Blaufox MD, 1982, "*Renal radiopharmaceuticals: an update*", Seminars in Nuclear Medicine, 12, 224-245
57. Kerl ME and Cook CR, 2005, "*Glomerular Filtration Rate and Renal Scintigraphy*", Clinical Techniques in small animal Practice, 20, 31-38
58. Schmidt DM, Scrivani PV, Dykes NL, Goldstein RM, Erb HN, Reeves AP, 2012, "*Comparison of glomerular filtration rate determined by use of single-slice dynamic computed tomography and scintigraphy in cats*", American Journal of Veterinary Research, 73, 463-469

SITOGRAFIA

- A. <http://www.superagatoide.altervista.org/nefrone.html>
- B. <http://www.my-personaltrainer.it/salute/calciuria.html>
- C. <http://www.iris-kidney.com>